



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“FORMULACIÓN, ELABORACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE UN  
ALIMENTO BALANCEADO PARA RATONES DE EXPERIMENTACIÓN (*MUS  
MUSCULUS*) DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y  
FARMACIA DE LA ESPOCH”**

**TESIS DE GRADO**

**Previa la obtención del título de  
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR  
EDWIN LEONARDO CEDEÑO NOBLECILLA  
RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo lo dedico a Dios, a mis padres Gladys y Juan por su incondicional apoyo, a mis hermanos María Gabriela y Juan Carlos, a mis abuelitos por ser parte de mi vida y todas aquellas personas que han estado en este camino de vida, a todos aquellos de alguna manera han sido artífices de este proyecto .*

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco primeramente a Dios por ser mi mentor de vida, mi apoyo incondicional, mi fortaleza, darme todo lo que tengo y por levantarme después de cada caída, a mis padres por ser aquellas magníficas personas que me han apoyado incondicionalmente en mis estudios,.*

*A todos los docentes de Bioquímica y Farmacia que supieron impartir todos sus conocimientos de una forma desinteresada para poder salir adelante en esta tesis.*

*A mis amigos Gabriel, María José, Lenis y Miguel por su amistad.*

*A Doris y Mariella dos personas muy importante en mi vida.*

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**Formulación, elaboración y control de calidad de un alimento balanceado para ratones de experimentación (*Mus musculus*) del bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH.**”, de responsabilidad del señor egresado Edwin Leonardo Cedeño Noblecilla, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez <b>DECANO FAC.CIENCIAS</b>	_____	_____
Dr. Iván Ramos <b>DIRECTOR DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA</b>	_____	_____
Dra. Olga Lucero <b>DIRECTORA DE TESIS</b>	_____	_____
Dr. Julio Idrovo <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
Dra. Verónica Sánchez <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
Tc. Carlos Rodríguez <b>DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN</b>	_____	_____
<b>NOTA DE TESIS ESCRITA</b>	_____	

Yo, Edwin Leonardo Cedeño Noblecilla, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

Edwin Leonardo Cedeño Noblecilla

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	Área
%	Porcentaje
(F)	Formulación de Blanco
(F1)	Formulación 1
(F2)	Formulación 2
Ab	Absorbancia
BIRF	Innato
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
BW	El peso corporal reducido a escala con la relación interespecífica de la producción de calor basal de adultos con el peso corporal (0.75kg).
cm	Centímetros
EFA	Ácidos grasos esenciales
EM	Energía metabolizable
g	Gramos
h	Hora
HB	Híbrido
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
kcal	kilocalorías
Kg	Kilogramo
kJ	Kilojulios
L	Litro
m	Metro
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Ms	Masa Seca
N.M.P	Número Más Probable
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
OB	Outbred (fuera de crianza)
°C	Grados Centígrados
p	Promedio
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
t	Tiempo
T	Total
UFC	Unidades formadoras de colonias

## ÍNDICE GENERAL

### INTRODUCCION

CAPITULO I.....	- 1 -
1. MARCO TEÓRICO.....	- 1 -
1.1. RATONES <i>Mus musculus</i> .....	- 1 -
1.1.1. CARACTERISTICAS DEL RATON <i>Mus musculus</i> .....	- 1 -
1.2. ALIMENTACIÓN.....	- 3 -
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA FORMULACIÓN DE DIETAS.....	- 6 -
1.2. FACTORES QUE AFECTAN A LOS REQUISITOS DE NUTRIENTES....	- 6 -
1.2.1. Genética.....	- 6 -
1.2.2. Etapa de la vida .....	- 7 -
1.2.3. Impactos ambientales .....	- 7 -
1.2.4. Estado microbiológico.....	- 8 -
1.2.5. Condiciones de investigación.....	- 9 -
1.2.6. Interacciones entre nutrientes.....	- 9 -
1.3. DIETAS DE INGREDIENTES NATURALES .....	- 10 -
1.3.1. Las Concentraciones de Nutrientes .....	- 11 -
1.4. DIETAS DE FORMULAS FIJAS .....	- 12 -
1.4.1. Las dietas purificadas .....	- 13 -
1.4.2. Las dietas químicamente definidas .....	- 13 -
1.4.3. Las concentraciones de nutrientes.....	- 14 -
1.5. FORMA FÍSICA DE LAS DIETAS .....	- 15 -
1.6. FABRICACIÓN Y ALMACENAMIENTO, PROCEDIMIENTOS Y OTRAS CONSIDERACIONES .....	- 17 -
1.6.1. Dietas de Ingredientes Naturales.....	- 18 -

1.6.2.	Dietas purificadas y química definida.....	19 -
1.7.	CONDICIONES AMBIENTALES DE LAS ZONAS DE ALMACENAMIENTO .....	19 -
1.8.	ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y CONTAMINANTES DE LOS POTENCIALES.....	21 -
1.9.	LA RESTRICCIÓN DIETÉTICA .....	24 -
1.10.	NECESIDADES NUTRICIONALES DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO: REQUERIMIENTOS DE NUTRIENTES DEL RATÓN .....	25 -
1.10.1.	DIVERSIDAD GENÉTICA.....	26 -
1.10.2.	ESTIMACIÓN DE LAS NECESIDADES DE NUTRIENTES .....	27 -
1.10.3.	ENERGÍA.....	31 -
1.10.4.	LÍPIDOS .....	35 -
1.10.4.1.	Ácidos grasos n-6 (EFA) .....	36 -
1.10.4.2.	Ácidos grasos n-3 (EFA). .....	37 -
1.10.5.	HIDRATOS DE CARBONO .....	38 -
1.10.6.	PROTEÍNAS .....	38 -
1.10.6.1.	Crecimiento .....	39 -
1.10.6.2.	Reproducción.....	39 -
1.10.7.	AMINOÁCIDOS.....	41 -
1.10.7.1.	Crecimiento .....	41 -
1.10.7.2.	Reproducción.....	44 -
1.10.8.	MINERALES .....	46 -
1.10.8.1.	Calcio y fósforo .....	46 -
1.10.8.2.	Magnesio .....	48 -
1.10.8.3.	Potasio .....	49 -
1.10.8.4.	Sodio, cloruro de sodio.....	49 -
1.10.8.5.	Cobre .....	50 -



1.10.8.6.	Hierro.....	- 51 -
1.10.8.7.	Manganeso.....	- 52 -
1.10.8.8.	Zinc.....	- 53 -
1.10.8.9.	Iodo, Selenio y Molibdeno .....	- 54 -
1.10.9.	VITAMINAS.....	- 56 -
1.10.9.1.	Vitamina A .....	- 56 -
1.10.9.2.	Vitamina D .....	- 58 -
1.10.9.3.	Vitamina E.....	- 59 -
1.10.9.4.	Vitamina K .....	- 60 -
1.10.9.5.	Vitamina B12.....	- 60 -
1.10.9.6.	Biotina .....	- 61 -
1.10.9.7.	Colina .....	- 62 -
1.10.9.8.	Folatos .....	- 63 -
1.10.9.9.	Niacina.....	- 64 -
1.10.9.10.	Ácido Pantoténico.....	- 64 -
1.10.9.11.	Vitamina B6 (Piridoxina, Piridoxal, Piridoxamina) .....	- 65 -
1.10.9.12.	Riboflavina.....	- 66 -
1.10.9.13.	Tiamina .....	- 67 -
1.10.10.	OTROS COMPONENTES BENEFICIOSOS .....	- 68 -
1.10.10.1.	Fibra .....	- 68 -
1.10.10.2.	Ácido Ascórbico .....	- 69 -
1.10.10.3.	Mio-inositol .....	- 70 -
CAPÍTULO II.....		- 72 -
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	- 72 -
2.1.	LUGAR DE INVESTIGACIÓN .....	- 72 -
2.2.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	- 72 -

2.2.1.	MATERIAL VEGETAL.....	- 72 -
2.2.2.	EQUIPOS.....	- 73 -
2.2.3.	MATERIALES.....	- 74 -
2.2.4.	REACTIVOS .....	- 74 -
2.2.5.	MEDIOS DE CULTIVO.....	- 75 -
2.3.	MÉTODOS .....	- 75 -
2.3.1.	REQUERIMIENTOS NUTRICIONES DEL RATÓN <i>Mus musculus</i> .....	- 75 -
2.3.2.	FORMULACION DEL ALIMENTO BALANCEADO .....	- 76 -
2.3.3.	ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES .....	- 76 -
2.3.4.	ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LAS DOS FORMULACIONES...	- 77 -
2.3.4.1.	DETERMINACIÓN DEL PH .....	- 77 -
2.3.4.2.	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA .....	- 78 -
2.3.4.3.	DETERMINACIÓN DE GRASA O EXTRACTO ETÉREO .....	- 79 -
2.3.4.4.	DETERMINACIÓN DE CENIZAS .....	- 81 -
2.3.4.5.	DETERMINACIÓN DE FIBRA.....	- 82 -
2.3.4.6.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.....	- 84 -
2.3.4.7.	EXTRACTO LIBRE NO NITROGENADO (ELnN).....	- 85 -
2.3.4.8.	DETERMINACIÓN DE CALCIO Y FÓSFORO.....	- 86 -
2.3.5.	ANÁLISIS MICROBIOLOGICO .....	- 86 -
2.3.5.1.	ANÁLISIS MICROBIOLOGICO DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS .....	- 86 -
2.3.5.2.	DETERMINACION DE HONGOS (MOHOS Y LEVADURAS).....	- 87 -
2.3.5.3.	DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES Y <i>E. Coli</i> .....	- 88 -
2.3.5.4.	DETERMINACION DE COLIFORMES TOTALES .....	- 89 -
2.3.6.	EVALUACION DE LA EFICACIA DE LAS FORMULACIONES.....	- 90 -
2.3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	- 91 -

CAPÍTULO III .....	- 92 -
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 92 -
3.1. FORMULACION DEL ALIMENTO BALANCEADO .....	- 92 -
3.2. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES .....	- 95 -
3.3. ANALISIS BROMATOLÓGICO .....	- 95 -
3.3.1. DETERMINACIÓN DEL PH.....	- 95 -
3.3.2. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA .....	- 96 -
3.3.3. DETERMINACIÓN DE CENIZAS .....	- 97 -
3.3.4. DETERMINACIÓN DE FIBRA .....	- 98 -
3.3.5. DETERMINACIÓN DE GRASA O EXTRACTO ETÉREO .....	- 99 -
3.3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA .....	- 100 -
3.3.7. DETERMINACIÓN DE CALCIO .....	- 101 -
3.3.8. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO .....	- 102 -
3.3.9. EXTRACTO LIBRE NO NITROGENADO (ELnN).....	- 103 -
3.4. ANALISIS MICROBIOLÓGICO .....	- 104 -
3.4.1. DETERMINACIÓN DE RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS ..	- 104 -
3.4.2. DETERMINACIÓN DE HONGOS (MOHOS Y LEVADURAS) .....	- 105 -
3.4.3. DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES Y <i>E. coli</i> .....	- 106 -
3.4.4. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES .....	- 107 -
3.5. EVALUACIÓN DE INCREMENTO DE PESO.....	- 108 -
CONCLUSIONES.....	- 114 -
CAPITULO V .....	- 115 -
RECOMENDACIONES .....	- 115 -
CAPITULO VI.....	- 116 -
RESUMEN .....	- 116 -
SUMARY .....	- 117 -

CAPITULO VIII .....	- 119 -
BIBLIOGRAFIA .....	- 119 -

### ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1 Formulación F1 y análisis de nutrientes.....	- 92 -
Cuadro N° 2 Formulación F2 y análisis de nutrientes.....	- 93 -
Cuadro N° 3 Evaluación de incremento de peso para formulación de blanco (F) .-	108 -
Cuadro N° 4 Evaluación de incremento de peso para la formulación (F1).....	- 109 -
Cuadro N° 5 Evaluación de incremento de peso para la formulación (F2).....	- 110 -
Cuadro N° 6 Análisis de anova: un factor .....	- 112 -
Cuadro N° 7 Comparaciones múltiples .....	- 112 -
Cuadro N° 8 Diferencias estadísticas .....	- 113 -
Cuadro N° 9 Homocedasticidad .....	- 113 -

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Promedio de crecimiento de las especies normalmente usadas de ratones del laboratorio.....	- 27 -
Tabla N° 2 Requisitos nutricionales estimados de ratones.....	- 29 -
Tabla N° 3 Requerimientos de proteína para el crecimiento de varias cepas de ratones.....	- 40 -
Tabla N° 4 Requisitos de aminoácidos para el crecimiento de varias cepas de ratones .....	- 44 -

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1	Relación de pH en las formulaciones -----	- 95 -
Gráfico N° 2	Relación de contenido de humedad en las formulaciones -----	- 96 -
Gráfico N° 3	Relación de contenido de cenizas en las formulaciones-----	- 97 -
Gráfico N° 4	Relación de contenido de fibra en las formulaciones-----	- 98 -
Gráfico N° 5	Relación de contenido de extracto etéreo en las formulaciones -----	- 99 -
Gráfico N° 6	Relación de contenido de proteína en las formulaciones-----	100 -
Gráfico N° 7	Relación de contenido de calcio en las formulaciones -----	101 -
Gráfico N° 8	Relación de contenido de fósforo en las formulaciones -----	102 -
Gráfico N° 9	Relación de contenido de ELnN en las formulaciones -----	103 -
Gráfico N° 10	Relación de Aerobios Mesófilos en las Formulaciones-----	104 -
Gráfico N° 11	Relación de Hongos (mohos y levaduras) en las Formulaciones -----	105 -
Gráfico N° 12	Relación de Coliformes fecales y <i>E. coli</i> en las Formulaciones -----	106 -
Gráfico N° 13	Relación de Coliformes Totales en las Formulaciones -----	107 -

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el ratón de laboratorio es reconocido como el modelo preeminente para la investigación genética moderna. Los ratones también se utilizan en una variedad de otros tipos de investigación, incluyendo el cáncer, la inmunología, la toxicología, metabolismo, biología del desarrollo, la diabetes, la obesidad, el envejecimiento y la investigación cardiovascular. Ellos son apreciados por muchas cualidades, incluyendo su tamaño pequeño, corto tiempo de generación, y la facilidad de reproducción en el laboratorio. El hecho de que son genéticamente los mejor caracterizados de todos los mamíferos, aumenta su valor para todos los campos de estudio.

El estado nutricional de un animal de laboratorio está directamente relacionado con la alimentación que recibe (cualitativa y cuantitativamente). Un correcto estado nutricional permite que el animal alcance todo su potencial genético en aspectos como el crecimiento, la reproducción y las expectativas de vida (longevidad); a su vez, todo ello afecta al estado físico y a su salud global. Asimismo, una alimentación correcta hace que el animal tenga respuestas más favorables a factores de estrés ambiental, como la presencia de patógenos.

La nutrición es una variable que puede afectar, en distintos sentidos, a los resultados experimentales obtenidos. Así, los resultados de un determinado estudio pueden estar sesgados, o falseados de forma involuntaria, por factores que afectan a la composición de la dieta que ingieren los animales, como pueden ser los cambios desconocidos en los constituyentes de la misma. Esta alteración de la información experimental obtenida puede llevar a conclusiones erróneas o no exactas que suponen el sacrificio inútil de individuos y una pérdida de tiempo y de recursos de investigación.

Para realizar una correcta planificación de la alimentación y conseguir un estado nutricional óptimo, se deben conocer las necesidades nutricionales de tipo tanto cuantitativo como cualitativo de las diferentes especies.

El alimento es el material primario a partir del cual se van a formar y renovar los tejidos y estructuras corporales, tanto las nuevas como las ya existentes, que deben ser reemplazadas debido al proceso de desgaste. La nutrición es determinante en los estados sucesivos de crecimiento y producción de los animales, de ahí que haya alimentos específicos para cada especie y hasta para cada etapa de su vida.

“Se debe contar con un procedimiento para la elaboración del alimento y los requisitos que este debe reunir, tales como: 1.-Composición, que deberá cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactancia y mantenimiento del ratón; 2.- Debe ser agradable al paladar (palatable) y digestible. 3.-Tener fecha de elaboración y caducidad; 4.- Certificado de análisis químico proximal y microbiológico por cada lote; 5.- Estar libre de harina de pescado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes patógenos. 6.- El alimento en forma de pellet debe tener la consistencia requerida, para evitar pérdida del alimento y el animal pueda consumirlo”. (1)

Los animales deben ser alimentados con dietas apetitosas, no-contaminadas y nutricionalmente adecuados, diariamente o de acuerdo a sus requerimientos particulares, a menos que el protocolo en el que están siendo empleados lo demande de otra manera.

La alimentación adecuada mediante una dieta apropiada a los ratones de experimentación “*Mus musculus*” garantizara resultados confiables en la experimentación animal que se realiza en las prácticas de la cátedra de Farmacología y en cada una las tesis que se elaboran con la experimentación en ratones *Mus musculus* en la Escuela de Bioquímica y Farmacia-ESPOCH.

En este contexto la presente investigación tuvo como objetivo formular, elaborar y controlar la calidad de un alimento balanceado para ratones de experimentación *Mus musculus*. Para lo cual primero se estableció los requerimientos nutriciones de la especie, se continuó con la formulación y elaboración del balanceado y finalmente se evaluó su calidad e inocuidad.

El producto elaborado se ajusta a los requisitos establecidos por los subcomités de nutrición del *National Research Council Committee* que han preparado documentos completos acerca de los requerimientos nutricionales de los animales de laboratorio, temas de control de calidad, ausencia de contaminantes químicos y microbiológicos y la presencia de tóxicos naturales de los ingredientes.



## **CAPITULO I**

### **1. MARCO TEÓRICO**

#### **1.1. RATONES *Mus musculus***

##### **1.1.1. CARACTERISTICAS DEL RATON *Mus musculus***

###### **TAXONOMÍA**

Clase: Mamalia

Orden: Rodentia

Familia: Muridae

Género: Mus

Especie: musculus

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, comensal del hombre. Se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general las especies prefieren lugares más secos que húmedos. Es de hábitos nocturnos, sociales y su comportamiento está influenciado por feromonas.

Posee un agudo sentido de la audición, y responde a un amplio rango de secuencias ultrasónicas, por ejemplo cuando la hembra con cría sale del nido, sus crías emiten sonidos ultrasónicos que inmediatamente son percibidos por la madre. En el laboratorio los ratones se alteran por sonidos de muy baja frecuencia, por lo que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan dentro del mismo.

El sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social.

La visión es muy pobre, la retina tiene muy pocos conos, y por lo tanto no pueden percibir los colores. Poseen una glándulas con forma de herradura en la órbita del ojo llamadas Glándulas Harderianas, cuando el ratón está estresado excreta una sustancia amarronada “porfirina” en la zona periocular.

El sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien desarrollado. Generalmente son muy dóciles a excepción de algunas cepas exocriadas que mantienen su agresividad, muestra de ello es el canibalismo de los ratones jóvenes puede ser un serio problema en colonias endocriadas. El manejo de los recién nacidos deben hacerse manipulados de manera suave y tranquila, y devolver la camada al nido lo más pronto posible. Por su pequeño tamaño corporal son muy susceptibles a cambios ambientales, aún pequeños cambios de temperatura (2 a 3 °C) pueden afectar la temperatura corporal del animal y modificar su fisiología.

El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm. desde la punta de la nariz a la punta de la cola, el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30g Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactación. Son omnívoros y el bazo del macho es mayor que el de la hembra. (3)

## 1.2. ALIMENTACIÓN

Los animales deben ser alimentados con dietas apetitosas, no-contaminadas y nutricionalmente adecuados, diariamente o de acuerdo a sus requerimientos particulares, a menos que el protocolo en el que están siendo empleados lo demande de otra manera.

Los gerentes/administradores de las colonias de animales deben emplear su buen juicio al comprar, transportar, almacenar y manipular los alimentos para reducir al mínimo la introducción de enfermedades, parásitos y vectores potenciales de enfermedades (ej., insectos y otras plagas) y contaminantes químicos a las colonias animales. Se aconseja a los encargados de compras examinar a los fabricantes, sus prácticas y procedimientos de provisión para proteger y asegurar la calidad del alimento (ej. almacenaje, control de plagas y procedimiento de manipulación). Las instituciones deben exigir a los fabricantes de alimentos que presenten periódicamente los resultados de los análisis del contenido de nutrientes críticos de las dietas. El usuario debe conocer la fecha de fabricación y otros factores que afecten la vida media de almacenamiento del alimento. El alimento viejo o el alimento transportado y almacenado incorrectamente pueden volverse deficiente en nutrientes.

Las áreas en las cuales se almacenan o procesan los ingredientes de las dietas deben mantenerse limpias y cerradas para evitar la entrada de plagas. El alimento no debe almacenarse en el piso sino en tarimas, estantes o carros. Los sacos abiertos, en tanto no se usen, deben guardarse en envases a prueba de plagas para reducir al mínimo la contaminación y para evitar la diseminación de enfermedades potenciales. La exposición a temperaturas superiores a los 21° C (70° F), humedades relativas extremas, condiciones malsanas, luz, oxígeno, insectos y otras plagas, acelera el deterioro del alimento. Los factores contaminantes de un alimento pueden tener efectos dramáticos sobre los procesos bioquímicos y fisiológicos, aún si solo están presentes en concentraciones tan bajas que no causen signos clínicos de intoxicación. Por ejemplo, algunos contaminantes inducen la síntesis de enzimas hepáticas que pueden alterar la respuesta del animal a los

fármacos. Algunos protocolos experimentales pueden requerir el uso de dietas probadas previamente para identificar tanto los contaminantes biológicos como los no biológicos y documentar sus concentraciones.

La mayoría de las dietas secas para animales hechas a base de ingredientes naturales y que contienen conservadores se pueden usar hasta seis meses después de su fabricación, siempre y cuando las condiciones de almacenaje hayan sido apropiadas. Sin embargo, la vitamina C en los alimentos industrializados por lo general solo tienen una vida de almacenamiento de tres meses, el uso de formas estabilizadas de vitamina C puede extenderla. En caso de que se tenga que alimentar a los animales con una dieta que contiene vitamina C caduca, será necesario suplementar adecuadamente con esa vitamina. La refrigeración preserva la calidad nutricional y prolonga la vida de almacenamiento; sin embargo, la duración del lapso de almacenamiento deberá reducirse al mínimo y se deberán observar las recomendaciones del fabricante. Con frecuencia las dietas purificadas y las químicamente definidas son menos estables que las dietas a base de ingredientes naturales y su vida de almacenamiento generalmente son menores a seis meses; estas dietas deben almacenarse a temperatura de 4° C o más baja.

Las dietas esterilizables en autoclave requieren ajustes en la concentración de nutrientes, tipos de ingredientes y métodos de preparación, para soportar la degradación causada por la esterilización. Se debe anotar la fecha de esterilización y usar el alimento lo antes posible. Las dietas irradiadas se pueden considerar como una alternativa a las dietas esterilizables en autoclave.

El diseño y ubicación de los comederos deben permitir un fácil acceso al alimento y reducir al mínimo la contaminación con orina y heces. Cuando los animales se alojen en grupos deberá haber suficiente espacio y suficientes lugares en donde alimentarse, para reducir al mínimo la competencia por la comida y asegurar el acceso a ella de todos los animales, especialmente si el protocolo experimental o las prácticas de manejo restringen

el alimento. Los contenedores de alimento no deben cambiarse entre áreas que representen diferentes riesgos de contaminación. Estos deben ser limpiados y sanitizados\* regularmente.

Se ha demostrado que la restricción moderada de la ingestión de calorías y proteínas por razones clínicas o de manejo, disminuye la obesidad, reproducción y la frecuencia de cáncer, aumentando la longevidad en varias especies. Esta restricción puede lograrse disminuyendo la energía metabolizable, la densidad de proteínas o ambas en la dieta o controlando la cantidad de la ración o la frecuencia de la alimentación. La selección del mecanismo de restricción calórica depende de la especie y alterará las adaptaciones fisiológicas y las respuestas metabólicas. En algunas especies como roedores y conejos la restricción calórica es una práctica aceptada en el alojamiento a largo plazo y como auxiliar en algunos procedimientos clínicos y quirúrgicos.

La dieta debe estar balanceada nutricionalmente; está bien documentado que cuando se ofrece una variedad de alimentos desbalanceados, para muchos animales se seleccionan una dieta inapropiada y se vuelven obesos por elegir alimentos con alta energía y baja proteína. Se deben minimizar los cambios bruscos en el régimen (que son difíciles de evitar al destete), ya que pueden conducir a trastornos digestivos y metabólicos; estos cambios ocurren tanto en omnívoros como en carnívoros, pero los herbívoros son particularmente sensibles. (22)

\*N.T. La palabra sanitización es un anglicismo que describe el procedimiento que destruye las formas vegetativas de los microorganismos patógenos mediante la exposición de los objetos durante un lapso suficiente a una temperatura mínima de 82.2° C.

## 1.1. CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA FORMULACIÓN DE DIETAS

El estado nutricional de los animales de laboratorio influye en su capacidad para alcanzar su potencial genético de crecimiento, la reproducción y la longevidad y para responder a los patógenos y otros problemas ambientales. Una dieta equilibrada es importante tanto para el bienestar de los animales de laboratorio y para asegurar que los resultados experimentales no están sesgados por factores nutricionales no deseados.

Los animales de laboratorio requieren alrededor de 50 nutrientes en la dieta adecuada concentración. Tablas que detallan las previsiones de las necesidades mínimas de nutrientes de los animales de laboratorio se presentan en esta tesis. Es importante reconocer que las necesidades estimadas en estas tablas han sido determinadas en determinadas condiciones restrictivas. Palatabilidad de los alimentos y la ingesta, la absorción de nutrientes y la utilización y excreción puede verse afectada por las características físico-químicas de los alimentos, tales como la forma física, las propiedades sensoriales, compuestos naturales o anti-nutrientes, refractarios, los contaminantes químicos, y las condiciones de almacenamiento. Muchos factores biológicos también influyen en los requerimientos de nutrientes. (2)

## 1.2. FACTORES QUE AFECTAN A LOS REQUISITOS DE NUTRIENTES

### 1.2.1. Genética

Las diferencias genéticas entre las especies, razas, variedades, poblaciones, sexos y los individuos pueden afectar a los requerimientos de nutrientes. Por ejemplo, la falta de L-gulonolactona oxidasa (una enzima clave necesaria para la síntesis de ácido ascórbico) en algunas especies es al parecer la consecuencia de una mutación genética. L-gulonolactona oxidasa difiere entre las especies de roedores, entre cepas de ratas, y entre

los sexos dentro de las cepas de ratas. Una rata mutante incluso se ha descubierto que, al igual que el conejillo de indias, carece de L-gulonolactona oxidasa y tiene un requisito obligatorio la dieta para el ácido ascórbico. Hay evidencia de que las necesidades de riboflavina, ácido pantoténico, y otros nutrientes difieren en las cepas de ratón pueden ser diferentes. Las diferencias genéticas en el potencial de crecimiento entre las especies, variedades y sexos pueden influir en los requerimientos diarios de aminoácidos y otros nutrientes que se incorporan a los tejidos.

### **1.2.2. Etapa de la vida**

Las necesidades de nutrientes cambian durante las etapas del ciclo de vida, especialmente en respuesta al crecimiento, el embarazo o la lactancia. Síntesis de los tejidos o productos requiere aminoácidos, ácidos grasos, minerales, glucosa, u otros sustratos, así como una mayor cantidad de vitaminas y cofactores asociados. Lo mismo es probablemente cierto para los animales de laboratorio, sin embargo, pocos estudios concluyentes han sido reportados. Como resultado, para la mayoría de los nutrientes, no es actualmente posible establecer requisitos diferentes para las distintas etapas de la vida de cada especie de animales de laboratorio.

### **1.2.3. Impactos ambientales**

Los requerimientos de nutrientes se estudian bajo condiciones controladas con una mínima variación diurna o estacional de la temperatura, el ciclo de luz, o cualquier otra condición. Marcada modificación de estas condiciones pueden alterar los requerimientos de nutrientes. Por ejemplo, la exposición a temperaturas por debajo del umbral inferior de la neutralidad térmica aumenta las necesidades de energía que los animales se ven obligados a gastar energía para mantener una temperatura corporal constante. El consiguiente aumento de la ingesta de alimentos puede permitir la alimentación con dietas de baja densidad de nutrientes sin disminuir la ingesta de nutrientes. Altas

temperaturas, los estímulos perturbadores, los conflictos sociales, u otros factores ambientales que reducen la ingesta de alimentos puede requerir una alimentación rica en las concentraciones de nutrientes para mantener una adecuada ingesta de nutrientes.

Tipos de vivienda también puede afectar a las cantidades de nutrientes necesarios en la dieta. Por ejemplo, los roedores de laboratorio mantenidos en jaulas ya sea galvanizado o jaulas con fondo sólido puede tener un menor requerimiento de la dieta para el zinc debido a la disponibilidad de zinc a partir de las heces y los materiales de la jaula. Minerales solubilizados en el agua potable (como el cobre de las tuberías de agua de cobre) puede afectar a las cantidades de estos minerales que deben ser aportados por la dieta. Si los animales de laboratorio ingieren ropa de cama u otros materiales "no comestibles", estos pueden proporcionar una fuente involuntaria de algunos nutrientes o toxinas. En los estudios de las necesidades de los animales de laboratorio para los componentes que podrían ser necesarios en concentraciones extremadamente bajas, incluso el suministro de aire puede ser una fuente importante de contaminación.

#### **1.2.4. Estado microbiológico**

En condiciones de crianza normal, los animales de laboratorio pueden albergar poblaciones de microorganismos en el tracto digestivo. Estos microorganismos generan diversos componentes orgánicos como productos o subproductos del metabolismo, incluyendo varias vitaminas solubles en agua y aminoácidos. La medida en que estos nutrientes contribuyen a la nutrición del huésped puede ser considerable, pero varía según la especie, composición de la dieta, y las condiciones de cría. En la rata y el ratón, la mayor parte de la actividad microbiana en el colon, y muchos de los nutrientes producidos por microorganismos que no están a disposición del huésped a menos que las heces se consumen, como es común para las ratas y otros roedores. Prevención de la coprofagia puede requerir un aumento en la concentración de nutrientes que deben ser aportados por la dieta. Parte de la pérdida de simbiosis microbianos o la totalidad de los animales libres de patógenos específicos y de los animales libres de gérmenes,



respectivamente, también puede alterar la síntesis microbiana de nutrientes y, por tanto, influyen en las necesidades dietéticas. Ajustes en las concentraciones de nutrientes, el tipo de ingredientes y métodos de preparación deben ser considerados en la formulación de dietas para animales de laboratorio criados en ambientes libres de gérmenes o de ambientes libres de patógenos específicos.

#### **1.2.5. Condiciones de investigación**

Procedimientos experimentales pueden producir estrés o alterar la ingesta de alimentos. Por ejemplo, procedimientos quirúrgicos o sustancias de prueba en la dieta puede conducir a la anorexia, que requieren el suministro de las dietas más aceptable o dietas con altas concentraciones de nutrientes. Protocolos experimentales que requieren restricción de la cantidad de comida que se ofrece alterar la ingesta de todos los nutrientes menos que las concentraciones dietéticas son alterados para dar cuenta de los cambios en el consumo de alimentos.

#### **1.2.6. Interacciones entre nutrientes**

Alteraciones en la densidad de energía de la dieta suele provocar un cambio en el consumo de alimento. Si las dietas de alta energía se utilizan, puede ser necesario aumentar la concentración de nutrientes en la dieta para compensar la disminución del consumo de alimentos. Otras interacciones se producen entre los nutrientes, tales como la competencia para los sitios de absorción de ciertos minerales entre los que comparten un sistema común de transporte activo. Así, en la formulación de las dietas que contienen inusuales concentraciones de nutrientes, los efectos potenciales sobre otros nutrientes deben ser considerados y los ajustes realizados en las concentraciones de nutrientes, en su caso concentraciones previstas de los nutrientes. Elección de los ingredientes se verá influenciada por las especies que se alimentan y los objetivos de experimentación o de producción. Las concentraciones de nutrientes objetivo deben tener en cuenta las

necesidades estimadas de nutrientes, las posibles pérdidas de nutrientes durante la fabricación y el almacenamiento, la biodisponibilidad de nutrientes en los ingredientes, y el potencial de interacciones entre nutrientes.

Varios tipos de dietas se encuentran disponibles para su uso con animales de laboratorio. La selección del tipo más adecuado dependerá de la cantidad de control requerido sobre la composición de nutrientes, la necesidad de añadir sustancias de prueba, los posibles efectos de los microbios de alimentación, la aceptación por la dieta de los animales, y el costo. El despilfarro es también un problema con algunos tipos de dietas, que puede ser una desventaja si la ingesta cuantitativa se va a medir.

La dieta ideal para una colonia de animales en particular dependerá de los objetivos de producción o de experimentación. La dieta debe ser lo suficientemente aceptable para garantizar el consumo de una alimentación adecuada y debe ser nutricionalmente balanceada para que los nutrientes esenciales para los objetivos se proporcionen. También debe estar libre de sustancias o microorganismos que pueden ser tóxicos o causar una infección. Las dietas utilizadas en la investigación también deben ser de fácil reproducción para asegurar que los resultados puedan ser verificados por estudios adicionales.

Es común para clasificar las dietas para animales de laboratorio de acuerdo con el grado de refinamiento de los ingredientes.

### 1.3. DIETAS DE INGREDIENTES NATURALES

Dietas formuladas con productos y subproductos agrícolas, como granos integrales (por ejemplo, maíz molido, trigo molido), productos derivados de fábrica (por ejemplo, salvado de trigo, afrecho de trigo, harina de gluten de maíz), las comidas ricas en

proteínas (por ejemplo, harina de soja, harina de pescado), extraídos o procesados fuentes de minerales (por ejemplo, piedra caliza molida, harina de hueso), y se alimentan de otros animales ingredientes (por ejemplo, la melaza seca, harina de alfalfa) a menudo son llamados dietas de ingredientes naturales. Las dietas de ingredientes naturales comerciales para animales de laboratorio son los más comúnmente utilizados, pero las dietas especiales para los animales de investigación también pueden ser de este tipo. Este tipo de dieta es relativamente barato de fabricar y, si se presta la debida atención a la selección de ingredientes, es aceptable para la mayoría de los animales de laboratorio. Sin embargo, la variación en la composición de los ingredientes individuales puede producir cambios en las concentraciones de nutrientes de las dietas de ingredientes naturales. Las condiciones del suelo y el clima, el uso de fertilizantes y otros productos químicos agrícolas, procedimientos de recolección y almacenamiento, y los métodos de fabricación o de molienda pueden influir en la composición de los ingredientes individuales, con el resultado de que no hay dos lotes de producción de alimentos idénticos. El potencial de contaminación con residuos de plaguicidas, metales pesados, u otros agentes que puedan poner en peligro los datos experimentales es otra desventaja.

### **1.3.1. Las Concentraciones de Nutrientes**

La formulación de las dietas de ingredientes naturales se complica por el hecho de que cada ingrediente contiene muchos, si no la mayoría de los nutrientes, por lo que un ajuste en la cantidad de cualquier ingrediente produce cambios en las concentraciones de la mayoría de los nutrientes en el producto final. Por lo tanto, no es posible determinar de antemano la concentración de cada nutriente, sino que las dietas son formuladas para contener concentraciones mínimas de nutrientes específicos (tales como la proteína cruda, fibra, grasa, calcio y fósforo), y otros nutrientes se añaden a través de pre mezclas de vitaminas y minerales.

En la alimentación de los animales domésticos, las consideraciones de costo indican que, las dietas de los ingredientes naturales se formulan utilizando técnicas de programación

lineal que generan fórmulas dietéticas que se ajusten a establecer las concentraciones de nutrientes mínimos y máximos, y reducir al mínimo los costos de los ingredientes. Esto ha llevado a la comercialización de los productos de fórmula variable que difieren en la composición de ingredientes de un lote a otro en respuesta a los precios cambiantes de los ingredientes.

#### 1.4. DIETAS DE FORMULAS FIJAS

Un enfoque alternativo ha sido el desarrollo de las dietas de fórmula fija en las que los tipos y cantidades de los ingredientes no varían de lote a lote. Estas dietas son a menudo llamadas dietas de fórmula abierta cuando la fórmula se declaró abiertamente, como en las especificaciones utilizadas para solicitar ofertas competitivas entre los fabricantes. Una dieta de fórmula fija puede contener múltiples fuentes de proteínas, grasas e hidratos de carbono, reduciendo así la importancia de la variación en la composición de cualquier ingrediente particular de lote a lote. Una variedad de ingredientes también aumenta la probabilidad potencial de que ultra-trazas de los minerales de importancia nutricional, tales como cromo, níquel y estaño, se proporcionará en las concentraciones adecuadas. Debido a que es difícil demostrar que estos minerales son necesarios, y porque las cantidades en la mayoría de los ingredientes naturales son aparentemente adecuadas, estos minerales no se incluyen normalmente en pre mezclas minerales para la dieta de ingredientes naturales.

Los pasos en la formulación de una dieta de ingredientes naturales son revisados por Knapka (1985) y el Consejo Internacional de Ciencia Animal de Laboratorio (1987). Es importante reconocer que la biodisponibilidad de los nutrientes pueden ser más bajos en las dietas de ingredientes naturales que en dietas purificadas. Factores que pueden afectar la biodisponibilidad son la forma química de los nutrientes, los componentes que pueden unirse los nutrientes (como el fitato, los taninos y lignina), interacciones entre nutrientes y efectos de la elaboración. Por lo tanto, es prudente incluir nutrientes en concentraciones superiores a los requisitos mínimos, pero dentro del rango seguro. Información sobre las

tolerancias de vitaminas y minerales de los animales ha sido resumida en informes anteriores (National Research Council, 1980, 1987). La práctica común es utilizar mayores márgenes de seguridad para las vitaminas especialmente lábiles y de minerales.

#### **1.4.1. Las dietas purificadas**

“Las dietas que se formulan con un conjunto más refinado y restringido de los ingredientes se designan dietas purificadas. Sólo los ingredientes relativamente puro e invariable se deben utilizar en estas formulaciones. Ejemplos de tales ingredientes son la caseína y aislar la proteína de soja (como fuente de proteína), el azúcar y el almidón (como las fuentes de hidratos de carbono), aceite vegetal y la manteca de cerdo (como fuentes de grasas y ácidos grasos esenciales), una forma química extrae de la celulosa (como una fuente de fibra), y químicamente las sales inorgánicas pura y vitaminas. Las concentraciones de nutrientes en una dieta purificada son menos variables y controlados con mayor facilidad a través de la formulación que en una dieta de ingredientes naturales. Sin embargo, incluso estos ingredientes pueden contener cantidades variables de oligoelementos, y dietas experimentales destinados a producir carencias específicas posible que tenga que ser aún más restrictiva en cuanto a las especificaciones de los ingredientes. La posibilidad de contaminación química de estas dietas es también baja. Dietas purificadas se utilizan a menudo en los estudios de deficiencias nutricionales específicas y los excesos”. (27)

Por desgracia, no son fácilmente consumidos por todas las especies y son más costosos de producir que las dietas ingredientes naturales.

#### **1.4.2. Las dietas químicamente definidas**

Para los estudios en los que un estricto control sobre las concentraciones de nutrientes y componentes específicos es esencial, las dietas se han hecho con los ingredientes disponibles más elementales, tales como los aminoácidos individuales, azúcares específicos, definidos químicamente triglicéridos, ácidos grasos esenciales, sales minerales y vitaminas. Este tipo de dietas se llaman dietas químicamente definidas, ya que representan el más alto grado de control sobre las concentraciones de nutrientes. Lamentablemente, las dietas químicamente definidas no son fácilmente consumidos por la mayoría de las especies de animales de laboratorio y son generalmente demasiado caros para su uso general. Aunque las concentraciones de nutrientes en estas dietas son teóricamente fijadas en el momento en que se fabrican, la biodisponibilidad de los nutrientes puede ser alterada por la oxidación o la interacción de nutrientes durante el almacenamiento. Dietas químicamente definidas que pueden ser esterilizados por filtración se han desarrollado para su uso en libre de gérmenes y de bajo antígeno estudios.

#### **1.4.3. Las concentraciones de nutrientes**

Los ingredientes utilizados en dietas purificadas y químicamente definidas tienen la ventaja de que cada uno es esencialmente la fuente de una sola clase de nutrientes o nutrientes, lo que simplifica enormemente la tarea de formulación. Cada ingrediente debe ser cuidadosamente seleccionados sobre la base de la pureza, la consistencia de la oferta y la composición y propiedades físico-químicas, pero la decisión de la cantidad a utilizar es principalmente una función de la concentración de nutrientes planeado. Se debe prestar atención a la provisión de fuentes de todos los nutrientes esenciales debido a la omisión involuntaria de nutrientes traza y ultra traza en purificado y dietas químicamente definidas es más probable que con la alimentación natural de ingredientes. Los márgenes de seguridad por encima de las concentraciones de exigencia deben ser modestos y se refieren a las pérdidas potenciales causadas por la degradación oxidativa u otras reacciones que pueden ocurrir durante y después de la fabricación.

Impurezas siguen siendo una preocupación mayor con dietas purificadas (Consejo Internacional de Ciencia Animal de Laboratorio, 1987). Las fuentes de proteínas pueden suministrar cantidades variables, pero desconocido de vitaminas, minerales y ácidos grasos esenciales, almidón puede contener trazas de lípidos y ácidos grasos esenciales y los aceites pueden contener vitaminas solubles en grasa. Por lo tanto, es necesario seleccionar los ingredientes específicos, si el control estricto de un nutriente en particular es necesario. Las fuentes de proteínas para producir deficiencias de minerales traza son la levadura de torula para el cromo y el selenio; lacto albúmina de cobalto, la caseína de cobre, hierro y manganeso, y huevo en polvo blanco de zinc. Caseína contiene fósforo, proteína de soja contiene fitatos, que une los minerales.

Dietas químicamente definidas se formulan utilizando químicamente puros (grado analítico) nutrientes, como aminoácidos, ésteres de ácidos grasos, glucosa, vitaminas y sales minerales. En la selección de los ingredientes se deben considerar factores como la estabilidad química y solubilidad (en dietas líquidas), obviamente todos los nutrientes esenciales hay que añadir de forma individual. La disponibilidad de las diferentes formas químicas de los alimentos es una preocupación primordial en la formulación de las dietas de constitución química definida. Por ejemplo, las formas isoméricas de L-aminoácidos se producen en las proteínas de alimentos naturales. Sin embargo, los isómeros D de varios de los aminoácidos esenciales que apoyan el crecimiento de la rata. De estos, la metionina por sí solo parece estar tan bien utilizado en cualquiera de las formas.

### 1.5. FORMA FÍSICA DE LAS DIETAS

Las dietas para animales de laboratorio se pueden proporcionar en diferentes formas físicas. La forma más común en el uso de animales de laboratorio es la dieta de pellets, que normalmente se forman mediante la adición de agua a la mezcla de ingredientes de tierra y luego pasándola a través de un dado. El tamaño y la forma de los agujeros en la matriz de determinar la forma de pellets y cuchillas rotativas de control de la longitud, la

dieta se seca a la firmeza. Los aglutinantes se utilizan a veces para mejorar la calidad del pellet.

Dietas pellets son fáciles de manejar, almacenar y utilizar; reducir el polvo en las instalaciones de los animales; evitar que los animales de la selección de ingredientes de la elección, y tienden a minimizar el desperdicio. No es fácil, sin embargo, añadir compuestos de prueba o alterar las dietas granulado después de su fabricación.

Dietas extruidas son similares a las dietas de pellets, excepto la comida es forzada a través de un dado bajo presión y alta temperatura de vapor después de haber inyectado, por lo que el producto se expande a medida que emerge de la matriz. Dietas extruidas son menos densas que las dietas de pellets y son preferidos por algunos animales (por ejemplo, perros, gatos y primates no humanos). Dietas extruidas no son de uso común para los roedores de laboratorio debido a la mayor despilfarro durante la alimentación y mayores costos de producción.

Las dietas en forma de harina se utilizan a veces, ya que permite la incorporación de aditivos y compuestos de prueba después de la dieta ha sido fabricado. Estas dietas son a menudo ineficientes, sin embargo, debido a grandes cantidades puede ser desperdiciada, a menos alimentadores especialmente diseñados están disponibles. Además, las comidas torta bajo condiciones de almacenamiento seguro. Un problema adicional es que el polvo generado por la alimentación puede ser peligroso si los compuestos tóxicos se han añadido.

Una solución a este problema es añadir agentes gelificantes y agua a la harina hasta formar una masa cuajada que se puede cortar en cubos para la alimentación, sin embargo, los agentes gelificantes pueden contener hidratos de carbono, aminoácidos, y minerales que deben tenerse en cuenta en las formulaciones de la dieta. La dieta de gel requiere



refrigeración para retrasar el crecimiento microbiano y deben ser alimentados todos los días o con más frecuencia para mantener el contenido de humedad y por lo tanto la ingesta de alimentos.

Las dietas líquidas se han desarrollado para adaptarse a los requisitos específicos, tales como la esterilización de filtros. Las dietas líquidas se utilizan a menudo en los estudios de los efectos del alcohol sobre la utilización de los nutrientes y las necesidades. En algunos casos las dietas purificadas tomará la forma de una emulsión estable cuando se mezcla con agua. Los animales recién nacidos son alimentados con dietas líquidas que se derivan principalmente de los productos lácteos. Al igual que con las dietas de gel, se debe tener cuidado para almacenar dietas líquidas adecuadamente para evitar el crecimiento microbiano.

#### 1.6. FABRICACIÓN Y ALMACENAMIENTO, PROCEDIMIENTOS Y OTRAS CONSIDERACIONES

La fabricación eficiente de las dietas naturales ingredientes se requiere una inversión de capital para las instalaciones, aparatos de molienda, y los inventarios de los ingredientes que son menos costosos cuando se compran a granel. Por lo tanto, estas dietas de animales de laboratorio suelen ser fabricado comercialmente.

Dietas de animales de laboratorio no deben ser fabricadas o almacenadas en las instalaciones utilizadas para la alimentación de granja o de los productos que contienen aditivos tales como raticidas, insecticidas, hormonas, antibióticos, factores de crecimiento, o fumigantes. Áreas donde los ingredientes y las dietas son almacenados y procesados deben estar limpias y cerradas para evitar la entrada de los roedores salvajes, aves e insectos. Control de plagas de rutina es esencial. (36)

### **1.6.1. Dietas de Ingredientes Naturales**

El paso inicial en la fabricación de ingredientes naturales dietas es triturar todos los ingredientes a un tamaño de partícula similar para que puedan ser uniformemente mezclado en una mezcla homogénea. Tamaño de las partículas depende del tamaño de poro de la pantalla utilizada en un molino de martillo o un molino otros. El tamaño de partícula óptimo de los ingredientes del suelo depende del tipo de ingredientes que participan y la forma prevista físicas del producto final. Molienda puede mejorar la digestibilidad de los ingredientes por el aumento de la superficie que está expuesta a las enzimas digestivas, sin embargo, la molienda también puede aumentar las tasas subsiguientes de la destrucción de nutrientes por aumento de la exposición al oxígeno atmosférico y por la liberación de las enzimas responsables de los procesos auto catalítico.

Los ingredientes utilizados en grandes cantidades se suman directamente, mientras que los que se utilizan en pequeñas cantidades, como las vitaminas y minerales, se añaden a través de pre-mezclas. Vitamina por separado y pre-mezclas minerales deben utilizarse para reducir al mínimo la destrucción de las vitaminas por reacciones de oxidación catalizadas por minerales. Pre-mezclas deben estar preparados con un portador de tal manera que una cantidad se añade suficiente (por ejemplo, un 1 por ciento de la dieta) para evitar errores de peso y para asegurar una distribución homogénea de estos micronutrientes. Errores como la omisión de los ingredientes o la adición de cantidades incorrectas pueden ser minimizados mediante la verificación en una hoja de verificación de cada ingrediente que se añade.

La longitud de tiempo que una particular combinación de los ingredientes deben ser mezclados para la homogeneidad máxima depende de una serie de factores, incluyendo tamaño, la densidad de las partículas, la velocidad de mezclado, y el tamaño del mezclador. Mezclar excesivamente puede ocurrir, resultando en la separación de

partículas asociadas a las diferencias en la densidad, la forma física, y la susceptibilidad a cargas de electricidad estática que se puede desarrollar en los mezcladores.

Solo, la mezcla de alimentación suelen ser granulados. La composición de ingredientes, la cantidad de humedad y el calor, tamaño de la pastilla, las condiciones de funcionamiento y otros factores influyen en el tamaño, la dureza y la concentración de nutrientes de los pellets. Una cierta pérdida de vitaminas lábiles pueden ocurrir durante la granulación, especialmente si se realiza a altas temperaturas, sin embargo, el calor del proceso de granulación también puede inactivar enzimas, reducir las poblaciones bacterianas en la dieta, y, en algunos casos, mejorar la digestibilidad.

Muchas especies prefieren los productos granulados y, por tanto, aumentar la ingesta de alimentos voluntaria. Granulación también permite una reducción en el desperdicio.

#### **1.6.2. Dietas purificadas y química definida**

Purificada o dietas químicamente definidas pueden ser eficientemente preparado en los laboratorios o cocinas dieta con una cantidad mínima de aparatos especiales. Todas las dietas para animales de laboratorio deben estar preparadas en las instalaciones utilizadas exclusivamente para este fin y bajo normas estrictas para evitar la contaminación o errores en los tipos y cantidades de los ingredientes utilizados. La dieta purificada puede ser presionada en forma de comprimidos, granulados, o se alimenta en forma de polvo, pasta o gel. Cuidado se debe tener mucho cuidado para asegurar una mezcla homogénea cuando las sustancias de ensayo se añaden a la dieta purificada.

### **1.7. CONDICIONES AMBIENTALES DE LAS ZONAS DE ALMACENAMIENTO**

Estabilidad de los nutrientes de los alimentos en general, aumenta a medida que disminuye la temperatura y la humedad. La vida útil de cualquier lote particular de la alimentación depende de las condiciones ambientales de la zona de almacenamiento. Los alimentos almacenados en la temperatura y la humedad son altos se puede deteriorar en varias semanas. Natural de ingredientes almacenados en las dietas áreas con aire acondicionado se debe utilizar dentro de los 180 días de fabricación; las dietas que contienen vitamina C se debe utilizar dentro de los 90 días de fabricación. Vitaminas C y A son especialmente lábiles. Dietas almacenadas por largos períodos o bajo condiciones ambientales inusuales deben analizarse por los nutrientes antes de su uso. Dietas formuladas sin antioxidantes o con grandes cantidades de ingredientes altamente perecederos, como la grasa, pueden requerir un tratamiento o procedimientos especiales de almacenamiento. Esterilización de las dietas es esencial para libre de gérmenes y de los animales de patógenos específicos libre y es a menudo recomendable para los animales criados convencionalmente. Autoclave a temperaturas superiores a 100 ° C puede ser eficaz en el logro de la esterilidad completa mientras vapor penetra toda la carga durante un período suficiente de tiempo, pero una exposición excesiva debe ser evitada ya que esto agrava las pérdidas de vitaminas y afecta la calidad de proteína. Algunas autoclaves permiten un rápido calentamiento a altas temperaturas al vacío, con la consiguiente reducción del tiempo de exposición y las pérdidas de nutrientes. Las dietas pueden ser esterilizadas mediante radiaciones ionizantes, con menos daño a los nutrientes que se produce por la esterilización por calor, siempre y cuando las dietas son envasadas al vacío o nitrógeno y poca humedad está presente. Se ha sugerido que los suplementos de vitaminas termolábiles se incrementaron de dos a cuatro veces en las dietas para ser esterilizado para compensar las pérdidas potenciales durante la esterilización.

Dietas con altos niveles de grasa requieren la formulación de varias condiciones de conservación. Lípidos insaturados en la dieta es susceptible a la oxidación, que reduce la cantidad disponible de ácidos grasos esenciales (EFA). Características de los lípidos oxidados rancios puede reducir la aceptabilidad de la dieta. Un antioxidante (butilhidroxitolueno o etoxiquina en 0,01 a 0,02 por ciento del petróleo) debe ser añadido

al aceite. Como precaución adicional para reducir la descomposición, las dietas deben almacenarse a temperaturas  $4^{\circ}\text{C}$  en un recipiente que haya sido descargado con argón o nitrógeno antes de sellar. Cuando los aceites muy insaturados son alimentados (por ejemplo, los aceites de pescado), la dieta debe ser cambiada cada 24 a 48 horas. Además adicionar, DL- $\alpha$ -tocoferol puede ser necesario incluir en la dieta para prevenir la peroxidación in vivo.

### 1.8. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y CONTAMINANTES DE LOS POTENCIALES

Dada la posible importancia de la calidad de la dieta consistente de los resultados experimentales, un programa de rutina de los nutrientes del ensayo deben aplicarse para verificar la composición de las dietas de los animales de laboratorio. A pesar de omisión accidental o involuntaria inclusión de los ingredientes es rara, cuando ocurre que puede tener consecuencias desastrosas. Las discrepancias entre las concentraciones de nutrientes previsto y el real en los alimentos para animales de laboratorio pueden ocurrir como resultado de errores en la formulación, las pérdidas de nutrientes lábiles durante la fabricación y almacenamiento, y la variación del contenido de nutrientes de los ingredientes de los valores medios presentados en los cuadros.

El ensayo es particularmente importante cuando las dietas comerciales de la fórmula no declarados se utilizan debido a las concentraciones de nutrientes pueden diferir de los publicados por el fabricante. Por ejemplo, como harina de maíz comercial puede contener cantidades significativas de ácido linoléico, las dietas diseñadas para inducir una deficiencia de ácidos grasos esenciales son más eficaces cuando la sacarosa, en lugar de almidón, se utiliza. De lote a lote hay variación en la composición de nutrientes pueden ser sustanciales, incluso en las dietas de fórmula fija a partir de ingredientes naturales. Por ejemplo, en 94 lotes de una dieta de fórmula fija analizaron las concentraciones variaron de seis veces la vitamina A, casi cuatro veces la tiamina, y el doble de calcio. Sin embargo, parte de esta variación puede haber sido el resultado del muestreo o error

analítico. Variación en la dieta purificada, aunque de menor magnitud, puede ser importante si se proporcionan los nutrientes en concentraciones requisito.

Las muestras para el ensayo deben ser tomados de varias bolsas o contenedores de alimentos. Se debe tener cuidado para obtener una representante sub muestra, sobre todo si alguno de asentamiento o la segregación de las partículas de la dieta se ha producido. Análisis de nutrientes debe ser realizado por un laboratorio de buena reputación y de acuerdo con la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales métodos de análisis. El análisis debería incluir al menos los componentes proximal (humedad, proteína cruda, extracto etéreo, ceniza y fibra cruda o ácido-detergente) y los nutrientes de interés particular. Algunas vitaminas y otros nutrientes son difíciles de ensayo debido a concentraciones bajas o compuestos que interfieren o ambas cosas.

Potenciales químicos y contaminantes biológicos de los alimentos son una fuente importante de preocupación para la investigación toxicológica e inmunológica, pero pueden afectar a otros tipos de experimentos, así. El Consejo Internacional de Ciencia Animal de Laboratorio señaló siete sustancias indeseables en la alimentación de animales de laboratorio:

1. Plaguicidas;
2. Plagas (especialmente los insectos y ácaros);
3. Bacterias, toxinas bacterianas y micotoxinas;
4. Toxinas naturales de las plantas;
5. Productos de degradación de los nutrientes;
6. Nitratos, nitritos y nitrosaminas, y
7. Metales pesados.

Además, los errores en la formulación o la fabricación pueden dar lugar a cantidades peligrosas de esos nutrientes, como vitaminas A y D, y el cobre, que pueden ser tóxicos en concentraciones no muy por encima de las necesidades. El mayor potencial de contaminantes y otras sustancias no deseadas en la alimentación natural de ingredientes puede hacer que estas dietas inadecuadas para ciertos tipos de investigación. Sin embargo, fija la fórmula dietas pueden omitir ingredientes que tienden a ser particularmente variable (por ejemplo, algo de pescado y harina de carne) y prueba rigurosa de las materias primas para contaminantes específicos pueden eliminar los problemas de mayor potencial. Por ejemplo, en la fabricación de una dieta de fórmula fija de roedores, que era necesario restringir la harina de pescado a los lotes que se había demostrado que la baja en las concentraciones de nitrosaminas.

Las concentraciones máximas recomendadas aceptables de contaminantes químicos han sido publicados por distintos organismos (por ejemplo, Administración de Alimentos y Drogas de 1978, la Agencia de Protección Ambiental de 1979, el Consejo Internacional de Ciencia Animal de Laboratorio, 1987). Sobre la base de observar las cantidades de contaminantes y los posibles efectos tóxicos, proporcionan una lista de los límites recomendados por cerca de 40 contaminantes, incluyendo las aflatoxinas, las nitrosaminas, metales pesados, hidrocarburos clorados, organofosforados, los bifenilos policlorados, los nitratos y nitritos, conservantes y actividad estrogénica. También se propuso un sistema de puntuación para las dietas que se utilizarán en los estudios de toxicología química que permite la separación de las dietas probadas en los aceptables para el uso a largo plazo, los que sólo es aceptable a corto plazo (transitorio) usar, y los que deben ser rechazadas. Las pruebas de contaminantes debe ser una rutina en la investigación toxicológica y puede ser valiosa por lo menos en forma ocasional en otros estudios.

Técnicas de fabricación, las condiciones adecuadas de almacenamiento, y los alimentadores que evitar la contaminación fecal y la orina de las dietas minimizar, pero

no eliminar, los agentes biológicos bacterianos y otros en las dietas. La dieta es una fuente potencial de patógenos de los animales de laboratorio.

Se describe los procedimientos de muestreo y ensayo de alimentación de diversos organismos patógenos, así como las normas sobre el número y tipo de organismos aceptables en la dieta. Como se mencionó anteriormente, los procedimientos de esterilización se emplean para dietas de gérmenes y patógenos específicos libres de las colonias de animales. Dado que los residuos microbianos pueden ser inaceptables en las dietas bajas en antígenos necesarios para los estudios inmunológicos, el uso de dietas química definida puede ser necesario. (2)

#### 1.9. LA RESTRICCIÓN DIETÉTICA

Tradicionalmente, el máximo crecimiento y la reproducción se han utilizado como criterios para la evaluación de las dietas de los animales de laboratorio. Sin embargo, la evidencia de una serie de estudios indica que la restricción de la ingesta calórica en animales de laboratorio puede tener efectos beneficiosos sobre la vida, la incidencia y gravedad de las enfermedades degenerativas, y la aparición e incidencia de la neoplasia. Basándose en estos resultados, que los animales a comer ad libitum para producir el máximo crecimiento y la reproducción no puede ser coherente con los objetivos de largo plazo toxicológicos y estudios de envejecimiento.

Es importante para lograr la restricción calórica de los animales de prueba sin que se produzcan las deficiencias de nutrientes no deseados. Elevación de las concentraciones de nutrientes en la dieta puede ser necesario para asegurar que la ingesta de nutrientes de los animales cuyo consumo está restringido es comparable a la de los animales pueden comer ad libitum. Desafortunadamente, la relativamente poca información disponible sobre la medida en que la restricción calórica afecta a los requerimientos de nutrientes. (24)



#### 1.10. NECESIDADES NUTRICIONALES DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO: REQUERIMIENTOS DE NUTRIENTES DEL RATÓN

Con independencia de la especie y tipo de modelo experimental, estos animales necesitan ingerir una serie de nutrientes que son comunes a todos ellos. Los macronutrientes son las proteínas, los hidratos de carbono y las grasas. Los micronutrientes están constituidos por los minerales y vitaminas.

En la formulación de una dieta lo más importante es asegurar el aporte adecuado de los distintos nutrientes. Para ello, debemos conocer los requisitos de todos y cada uno de estos nutrientes para la especie considerada. Sin embargo, puesto que la cantidad de alimento ingerido va a venir determinada por las necesidades energéticas de la especie en cuestión, resulta esencial establecer la densidad calórica de la dieta, es decir, la cantidad de cada nutriente por un número determinado de kilocalorías (kcal) o kilojulios (kJ).

Los ratones *Mus musculus* se han utilizado ampliamente como modelos animales para la investigación biomédica en genética, oncología, toxicología e inmunología, así como la biología celular y del desarrollo. El uso generalizado de esta especie se puede atribuir a la tasa del ratón altas tasas de fecundidad, período de gestación corto, pequeño tamaño, facilidad de mantenimiento, la susceptibilidad o la resistencia a diferentes agentes infecciosos, y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas o genéticas que afectan a los seres humanos. Estimación de las necesidades cuantitativas de nutrientes de los ratones es particularmente difícil debido a la gran variación genética dentro de las especies y los diferentes criterios utilizados para evaluar la adecuación nutricional de las dietas. Investigación para determinar los requerimientos de nutrientes para la reproducción, la lactancia, y el mantenimiento de los ratones ha recibido relativamente poca atención.

“Un factor que complica la estimación de las necesidades de nutrientes de los ratones de laboratorio es que son criados y mantenidos en convencionales, específicas libres de patógenos, o libre de gérmenes entornos en los que la flora intestinal no está definido, que se define, o ausente, respectivamente. Debido a que las poblaciones de la flora intestinal influyen en las necesidades de nutrientes, no es válido generalizar los datos entre estos entornos”. (55)

### **1.10.1.DIVERSIDAD GENÉTICA**

Los ratones de laboratorio utilizados en la investigación biomédica y representan existencias no en las razas puras, cepas congénicas, y especies mutantes. El número de acciones individuales y cepas de ratones disponibles para su uso en la investigación se estima en cerca de 500. Además, hay cepas de ratones transgénicos numerosos recientemente desarrollados, el número exacto no está disponible, pero las estimaciones son tan altas como 20.000 cepas. Con esta cantidad de diversidad genética dentro de una especie de mamífero es alta la probabilidad de que habría diferencias en los requerimientos de nutrientes entre las distintas poblaciones y las cepas. A pesar de que un pequeño porcentaje de las reservas existentes y las cepas de ratones de laboratorio se han utilizado en la investigación nutricional, las discusiones de los nutrientes individuales, indican que las poblaciones de ratón o cepas difieren en sus requerimientos de nutrientes.

Las tasas de crecimiento publicadas de 38 poblaciones y las cepas de ratones muestran una diferencia de aproximadamente el doble entre los ratones en crecimiento más lentos y más rápidos. Las estadísticas de crecimiento de cinco poblaciones y las cepas que representan a esta gama de genotipo del ratón se muestran en la Tabla N° 1. Esta diferencia en el crecimiento sugiere una marcada diferencia en los requerimientos de nutrientes entre los genotipos de ratón. Teniendo en cuenta esta variación en las tasas de crecimiento, las tasas de crecimiento esperado o aceptable utilizar como normas que venir únicamente de las personas responsables del mantenimiento de la colonia de

reproducción que proporciona un determinado genotipo. La Reproducción, también, varía entre el genotipos e innata de las especies y sub especies.

**TABLA N° 1 PROMEDIO DE CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES NORMALMENTE USADAS DE RATONES DEL LABORATORIO.**

<b>Peso, g,</b>				
<b>Edad (semanas)</b>	<b>Suizo-Webster (OB)</b>	<b>BALB/c (BIRF)</b>	<b>DBA/2 (BIRF)</b>	<b>B6C3F1 (HB)</b>
<i>Hembra</i>				
<b>3</b>	12	12	11	9
<b>4</b>	14	14	15	14
<b>5</b>	23	16	18	16
<b>6</b>	24	17	19	17
<b>7</b>	26	18	20	18
<b>8</b>	26	18	21	20
<b>9</b>	27			
<b>10</b>	29			
<i>Varón</i>				
<b>3</b>	12	12	11	9
<b>4</b>	16	14	15	15
<b>5</b>	26	19	17	19
<b>6</b>	31	21	21	22
<b>7</b>	34	22	23	24
<b>8</b>	36	23	22	25
<b>9</b>	38			
<b>10</b>	40			
<b>Abreviaciones: OB, outbred; BIRF, innato; HB, híbrido</b>				

Fuentes: National Research Committee Council- 1998

### 1.10.2. ESTIMACIÓN DE LAS NECESIDADES DE NUTRIENTES

“Las necesidades de nutrientes de los ratones han sido definidos por diferentes criterios como el crecimiento, reproducción, longevidad, almacenamiento de nutrientes, la actividad enzimática, aspecto macroscópico o histológico de las lesiones de tejidos, y el ácido nucleico o el contenido de proteína del tejido. El requisito de cualquier nutriente

puede variar en función de los criterios utilizados. Tradicionalmente, el rápido crecimiento que lleva a tamaño máximo del cuerpo en la madurez ha sido la base para medir la adecuación de la dieta en el supuesto de que una dieta para promover el crecimiento máximo sería adecuada para la reproducción, la lactancia, y el mantenimiento” (10). Los datos han sido publicados que ponen a prueba la validez de esta hipótesis para el ratón, encontraron que las dietas producen un crecimiento post-destete máxima no apoyó las tarifas máximas de la reproducción. Como el ratón logra un tercio de su crecimiento total durante el período de amamantamiento, lactancia impone una mayor carga nutricional de la madre, y esto puede influir en algunos de los requisitos de nutrientes más que otro. Se ha informado que una dieta de caseína-almidón que contiene magnesio 0,05 por ciento era suficiente para el crecimiento de los ratones, pero la muerte repentina se produjo en algunas hembras lactantes cuando consumieron esta dieta. Un adicional de 0,02 por ciento de magnesio previene este síndrome, lo que indica la necesidad de un aumento en el requerimiento de magnesio durante la lactancia.

Estos resultados sugieren que las dietas que apoyen el crecimiento máximo no son óptimas para la reproducción. Por lo tanto, para la dieta del ratón, el significado del término "adecuado" puede tener que ser ampliado para indicar un rango de ingesta de nutrientes entre el mínimo y el exceso perjudicial, el alcance puede variar en diferentes etapas del ciclo de vida. Investigadores de la nutrición en general, se centran en las necesidades de nutrientes como mínimo concentraciones en la dieta. Aunque muchos estudios se han realizado sobre los efectos de la dieta sobre la longevidad, no hay suficientes datos publicados para estimar las necesidades de nutrientes para el mantenimiento a largo plazo de los ratones.

Los ratones mantenidos en libre de gérmenes, los entornos gnotobióticos, o libre de patógenos específicos, donde el tipo y el número de microorganismos intestinales se alteran, pueden requerir diferentes concentraciones en la dieta de nutrientes. Los ratones alimentados con una dieta esterilizada y libres de gérmenes, se ha observado la deficiencia marginal en varias vitaminas, y la reproducción en comparación con los

ratones criados convencionalmente. Se ha reportado que la adición de 20 mg de fitomenadiona bisulfito sódico / kg de alimentos a la dieta de los derivados de la histerectomía, los ratones mantenidos en un ambiente específico libre de patógenos arrestó a un brote espontáneo de hemotórax.

Teniendo en cuenta los numerosos factores genéticos y ambientales que influyen en las necesidades de nutrientes de los ratones de laboratorio, estudios controlados muy pocos se han realizado, sobre todo en los últimos años, para identificar los requerimientos nutricionales de esta especie. Como resultado de las estimaciones de las necesidades nutricionales se basan en los datos acumulados hace muchos años por cepas de ratón alimentado ingredientes de la dieta que ya no están disponibles o no pueden ser identificados, los resultados experimentales obtenidos a partir de estudios que no fueron diseñados para establecer los requerimientos de nutrientes, el consumo de nutrientes de los ratones alimentados con dietas que producen "resultados aceptables", y la suposición de que las necesidades de nutrientes del ratón son similares a los de la rata.

**TABLA N° 2 REQUISITOS NUTRICIONALES ESTIMADOS DE RATONES**

<b>Nutriente</b>	<b>Unidad</b>	<b>Suma de Kg, por dieta</b>	<b>Comentario/Referencia</b>
<b>Lípidos</b>	g	50.0	Vea Texto
<b>Acido de Linoléico</b>	g	6.8	Vea texto
<b>Proteína (N x 6.25)</b>			
<b>Crecimiento</b>	g	180.0	Equivalente a 20% la caseína complementó con 0.3% DL-metionina o 24% la caseína
	g	200.0	Caseína (vea texto)
<b>Reproducción</b>	g	180.0	Ingredientes naturales
<b>Aminoácidos</b>			
<b>Arginina</b>	g	3.0	Vea texto
<b>Histidina</b>	g	2.0	Vea texto
<b>Isoleucina</b>	g	4.0	Vea texto

<b>Leucina</b>	g	7.0	Vea texto
<b>Valina</b>	g	5.0	Vea texto
<b>Treonina</b>	g	4.0	Vea texto
<b>Lisina</b>	g	4.0	Vea texto
<b>Metionina</b>	g	5.0	Cistina puede reemplazar 50-66.6%
<b>Fenilalanina</b>	g	7.6	Tirosina puede reemplazar 50%
<b>Triptófano</b>	g	1.0	Niacina puede reemplazar 0.025%
<b>Minerales</b>			
<b>Calcio</b>	g	4.0	
<b>Cloruro</b>	g	0.5	
<b>Magnesio</b>	g	0.5	0.7 g/kg para la lactación (vea texto)
<b>Fósforo</b>	g	3.0	
<b>Potasio</b>	g	2.0	Pueden requerirse concentraciones más altas para la lactación (vea texto)
<b>Sodio</b>	g	0.5	
<b>Cobre</b>	mg	6.0	8.0 mg/kg para el embarazo y lactación
<b>Hierro</b>	mg	35.0	
<b>Manganeso</b>	mg	10.0	
<b>Zinc</b>	mg	10.0	30 mg/kg para la reproducción y lactación
<b>Yodo</b>	µg	150.0	
<b>Molibdeno</b>	µg	150.0	
<b>Selenio</b>	µg	150.0	Forma de selenita de Se
<b>Vitaminas</b>			
<b>A (Retinol) (a)</b>	mg	0.72	Santhanam et al., 1987
<b>D (calciferol) (b)</b>	mg	0.025	Adecuado; ningún datos cuantitativo
<b>E (RRR - -tocoferol) (c )</b>	mg	22.0	Yasunaga et al., 1982
<b>K (filoquinona)</b>	mg	1.0	Basado en el requisito para la rata; Kindberg y Suttie, 1989,
<b>Biotina (d-biotina) B8</b>	mg	0.2	Adecuado; el Fenton et al., 1950
<b>Colina (bitartrato de colina)</b>	mg	2,000.0	Adecuado; los datos insuficientes para establecer requisito
<b>Ácido fólico (B9)</b>	mg	0.5	Fenton et al., 1950; el Heid et al., 1992
<b>Niacina (ácido nicotínico) B3</b>	mg	15.0	Basado en el requisito para la rata; Hundley, 1949,
<b>Ácido Pantoténico (B5)</b>	mg	16.0	Morris y Lippincott, 1941, hacen pensar en 36 mg/kg para la reproducción y lactación
<b>Riboflavina (B2)</b>	mg	7.0	Adecuado; los datos insuficientes para

establecer requisito			
<b>Tiamina (tiamina-HCl)</b>	mg	5.0	
<b>B1</b>			
<b>B6 (piridoxina-HCl)</b>	mg	8.0	1 mg/kg para el mantenimiento
<b>Cobalina B12</b>	µg	10.0	Adecuado; los datos insuficientes para establecer requisito

**NOTA:** Se expresan requisitos Nutrientes en una base como-alimentada para dietas que contienen 10% la humedad y 3.8 a 4.1 kcal ME/g (16–17 kJ ME/g) y debe ajustarse para las dietas de diferir humedad y concentraciones de energía. A menos que por otra parte especificó, las concentraciones nutrientes listadas representan requisitos mínimos y no incluyen un margen de seguridad. Las concentraciones más altas para muchos nutrientes pueden garantizarse en dietas de ingredientes naturales.

(a) Un Equivalente a 2,400 IU/kg de dieta.

(b) Equivalente a 1,000 IU/kg de dieta.

(c) Equivalente a 32 IU/kg.

Fuentes: National Research Committee Council- 1998

### 1.10.3. ENERGÍA

Se ha encontrado que los ratones que consumieron una dieta promedio de 3,5 g / día durante 14 días después del destete. Se informó que los ratones machos consumieron un promedio de 3,75 g de dieta / día durante los 21 días después del destete y que los ratones con un mayor potencial genético de crecimiento, debido a un aparente simple mutación genética que el aumento de la ganancia de peso después del destete, una selección genética para el crecimiento, o una combinación de la selección de un solo gen, más genética consume 4,81, 4,57 y 6,18 g de dieta / día, respectivamente. La energía metabolizable (EM) el contenido se estimó en 3,9 kcal / g de dieta (16,2 kJ / g de dieta). No fue posible determinar si el requerimiento de energía de mantenimiento diferido para las diferentes cepas. Se informó que una línea de ratones seleccionados para el crecimiento post-destete rápida consume 5,0 g de dieta / día [18 kcal EM / día (75 kJ EM / día)] de 21 a 42 días de edad, mientras que una línea de ratones de la misma cepa, pero que no fueron seleccionados para un rápido crecimiento, se comió una dieta 3,8 g / día

(57,7 kJ EM / día). La energía necesaria para el mantenimiento era exactamente el mismo para ambas líneas 176 kcal EM/0.75kgBW/día (736 kJ EM/0.75kgBW/día). Bernier et al. (1986) examinó el efecto de la tasa de crecimiento de las necesidades energéticas de mantenimiento en dos líneas de ratones con un historial genético similar, con la excepción de que una línea había una sola mutación de genes que el aumento de la ganancia de peso sin alterar la composición del cuerpo. Se informó que los ratones normales consumen 12,7 kcal EM/0.75kgBW/día (53,3 kJ EM/0.75kgBW/día) de 21 a 42 días de edad y ganó 17,2 g de peso corporal, mientras que los ratones con el gen de crecimiento rápido consumen 17,4 kcal EM/0.75kgBW/día (72,8 kJ EM/0.75kgBW/día) y obtuvo 29,8 g de peso corporal. Sobre la base de un experimento comparativo masacre, los ratones tenían una creciente demanda de energía de mantenimiento de 155 kcal EM/0.75kgBW/día (648 kJ EM/0.75kgBW/día) en comparación con 164 kcal EM/0.75kgBW/día (686 kJ EM/0.75kgBW/día) en los ratones normales. Estos valores son ligeramente inferiores a las 176 kcal EM/0.75kgBW/día (736 kJ EM/0.75kgBW/día) informó Canolty y Koong (1976). Es probable que esta diferencia sea el resultado de un error de un 7 por ciento en la EM de la glucosa. El requisito de mantenimiento de energía estimado informó Bernier et al. (1986) es similar a la reportada por Webster (1983). Él encontró que el requerimiento de energía de mantenimiento de ratones adultos mantenerse a 24 ° C fue de 161 kcal EM/0.75kgBW/día (673 kJ EM/0.75kgBW/día).(19)

No es posible especificar un requerimiento de energía de mantenimiento para el ratón promedio de crecimiento sin suficiente información sobre el ratón y el medio ambiente. Genética y la dieta pueden tener una influencia sustancial en los requisitos de mantenimiento de energía estimado. Se informó de que cuando son alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono, los ratones obesos tenían un requisito de mantenimiento de energía estimado promedio de 73 kcal EM/0.75kgBW/día (305 kJ EM/0.75kgBW/día), mientras que lean ratones requiere 118 kcal EM/0.75kgBW/día (493 kJ EM/0.75kgBW/día). Aunque la base genética de estos ratones es diferente a los mencionados anteriormente, otros factores influyen en las estimaciones de las necesidades energéticas de mantenimiento. Lin et al. (1979) mantiene los ratones a una temperatura ambiental de 30 ° C durante las primeras 2 semanas después del destete y 26



° C para las siguientes dos semanas. Webster (1983) reportó que cuando la temperatura ambiente se elevó de 24 ° a 28 ° C, la producción de calor en los ratones disminuyó 21 por ciento, disminuyendo así la obligación de observar la energía de mantenimiento. Composición de la dieta también puede alterar los requerimientos de energía de mantenimiento. Lin et al. (1979) Informó que los ratones delgados alimentados con una dieta alta en carbohidratos tenía un requerimiento de energía de mantenimiento de 118 kcal EM/0.75kgBW/día (493 kJ EM/0.75kgBW/día), cuando se alimentaron con una dieta alta en grasas, su energía estimada de mantenimiento aumento de los requerimientos a 130 kcal EM/0.75kgBW/día (544 kJ EM/0.75kgBW/día) un aumento del 10 por ciento. Este efecto de la dieta no se observó en ratones obesos (Lin et al., 1979). Por lo tanto, la temperatura ambiental, la composición de la dieta, y la herencia genética deben ser consideradas al predecir los requisitos de mantenimiento de la energía. El sexo también debe ser considerado. Bull et al. (1976) informan de que los roedores hembras parecen tener un requisito de mantenimiento de energía más bajo que los hombres. Basado en sus observaciones, se estima que el requerimiento diario ME para el mantenimiento es de 160 kcal EM/0.75kgBW/día (670 kJ EM/0.75kgBW/día) en los ratones que no tienen alteraciones evidentes genética o inducida por el estrés o patologías. Una dieta que contiene 3,9 kcal EM / g (16,2 kJ EM / g) debe cumplir con este requisito.

Al igual que con la determinación de un requisito específico de energía para el mantenimiento, el desarrollo de un requerimiento de energía específica para una determinada tasa de crecimiento o de apoyo a la lactancia o el embarazo es muy difícil. En el caso del crecimiento, la composición de la ganancia debe ser considerada. Aumento de la grasa es un proceso energéticamente más eficiente que la ganancia en grasa. Además, la eficiencia energética con la que se utiliza una dieta para ganar apoyo depende, en parte, sobre la composición de la dieta. Que es energéticamente más eficiente para producir la grasa corporal de grasa en la dieta de lo que es la producción de grasa en el cuerpo de carbohidratos de la dieta. Kielanowski (1965) propuso que la ingesta total de ME (MEI) de los animales en crecimiento puede dividirse en tres partes: proporcional al peso corporal (lo que representa la energía necesaria para el

mantenimiento), un aumento de grasa de energía proporcional a la segunda y tercera proporcional en quien apoyarse energía ganancia. Varios problemas se han identificado en relación con el uso de este modelo. En general, el peso corporal reducido a escala con la relación inter específica de la producción de calor basal de adultos con el peso corporal ( $0.75\text{kg BW}$ ). Escala tal, sin embargo, tenía la intención de describir una relación entre las especies, no dentro de las especies (Webster, 1988). Bernier et al. (1987) demostraron que el exponente de peso afecta a las proporciones de la producción de calor asignados a mantenimiento y crecimiento. Por eso es importante, cuando se utiliza el Kielanowski (1965) del modelo, que el exponente del peso corporal elegido para representar a la producción de calor basal apropiado para la especie. Utilizando el del modelo Kielanowski (1965) y los datos generados por Bernier et al. (1986, 1987), la eficiencia energética estimada de ganancia de energía de grasa en dos líneas de ratones sería 189 y 161 por ciento, obviamente, una imposibilidad biológica. El uso de técnicas de regresión para estimar la eficiencia de ganancia de energía lean también conduce a resultados que son imposibles (Bernier et al, 1986, 1987,.. Thonney et al, 1991). Una estimación más precisa de las necesidades de energía sólo será posible con el desarrollo y ensayo de modelos mecanicistas. Teniendo en cuenta las preocupaciones planteadas anteriormente, es probable que el requisito de promedio diario de EM de ratones creciendo de 21 a 42 días de edad será recibido por su consumo de  $263 \text{ kcal EM}/0.75\text{kgBW}$  ( $1.100 \text{ kJ EM}/0.75\text{kgBW}$ ).

Durante la gestación temprana el requerimiento de energía es menos probable, pero puede ser tan alto como  $358,5 \text{ kcal EM}/0.75\text{kgBW}$  ( $1500 \text{ kJ EM}/0.75\text{kgBW}$ ) durante el tercer trimestre. Aunque los datos específicos de los requerimientos de energía y el apoyo de la lactancia para los ratones son notablemente deficiente, a partir de datos de roedores, se estima que la lactancia máxima podría requerir una MEI diaria de 311 hasta 430  $\text{kcal EM}/0.75\text{kgBW}$  ( $1300 \text{ a } 1800 \text{ kJ EM}/0.75\text{kgBW}$ ) para apoyar a la presa y camadas grandes. (2)

#### **1.10.4. LÍPIDOS**

Los lípidos son requeridos por el ratón para proveer ácidos grasos esenciales (EFA). Grasa de la dieta es otra fuente de energía concentrada y un portador de vitaminas solubles en grasa. Ayuda a la absorción de vitaminas solubles en grasa y aumenta la aceptabilidad de la dieta.

Bossert et al. (1950) demostraron que recién destetados (Dohme y cepas Suizo-Webster) los ratones aumentaron de peso igual de bien cuando son alimentados con dietas que contenían 0,5 a 40 por ciento de grasa, todas las dietas contenían 0,5 por ciento de aceite de maíz con el resto de la grasa suministrada por el aceite hidrogenado de semilla de algodón. Una disminución en el crecimiento se observó cuando el contenido de grasa de la dieta supera el 40 por ciento. Fenton y Carr (1951) demostró que el efecto de la concentración de grasa en la dieta sobre la ganancia de peso de los ratones maduros dependió de la cepa. Las cepas A y C3H tenían mayores tasas de ganancia de grasa en la dieta cuando se aumentó de 5 a 47 por ciento, mientras que las cepas C57 y yo no mostraron aumentos en la ganancia de peso cuando el contenido de grasa de la dieta se aumentó a más del 15 por ciento.

Knapka et al. (1977) encontraron una importante presión por interacción de grasa en la capacidad reproductiva (número de cachorros nacidos por camada, cachorros destetados por camada), cuando la dieta contiene 4, 8, y 12 por ciento de grasa cruda se alimentó a cuatro cepas diferentes de ratones (BALB / cc, C3H/HeN, C57BL/6N y DBA/2N). Por ejemplo, el número medio de cachorros nacidos y destetados a cada ratón BALB / cc durante la vida reproductiva de 38 a 46 cuando la grasa bruta se incrementó de 4 a 8 por ciento, mientras que el número de crías nacidas y destetadas por DBA / 2N ratones disminuyó de 13 a 8 con una creciente concentración de grasa cruda. Las otras dos cepas tuvieron respuestas similares (aunque menos dramática que) los de la cepa DBA/2N, lo que indica que la concentración absoluta de proteínas de la dieta cruda y grasa cruda en las dietas para la producción de estas cepas de ratón puras no es tan importante como la

relación de estos nutrientes. La reproducción del ratón también se vio afectada por las interacciones proteína  $\times$  grasa. Knapka y compañeros de trabajo (1977) sugiere que la proteína cruda óptima y las concentraciones de grasa deben ser inferiores a 18 por ciento y 10 por ciento a 11, respectivamente. (26)

Olson et al. (1987) describe un aumento en la tumorigénesis mamaria, la reducción de células T blastogénesis, y bajó de la inmunidad celular cuando la grasa (aceite de soja) que se nutre de C3H/OUJ ratones hembra fue aumentado de 5 a 20 por ciento de la dieta. Birt et al. (1989) señaló que dimetilbenzantraceno inducida por papilomas piel creció más rápidamente en los ratones alimentados con SENCA 24,6 por ciento frente al 5 por ciento de aceite de maíz la dieta. Kubo et al. (1987) observaron que la longevidad de (NZB  $\times$  NZW) F1 ratones hembra cuya alimentación se limita fue mayor que la de los controles se les permite alimentarse ad libitum. De las dietas de forma restringida, alta en grasas (69,8 por ciento de grasa) dietas de aumento de la longevidad sólo dos terceras partes, así como baja en grasas (4,5 por ciento de grasa) las dietas. Por estas razones, una dieta con una concentración de grasa de un 5 por ciento se recomienda, de forma similar a la sugerida para la rata. Esta concentración es adecuada, pero no puede apoyar el crecimiento máximo y la reproducción de todas las cepas de ratón.

#### **1.10.4.1. Ácidos grasos n-6 (EFA)**

El ratón, como la rata, requiere ácido linoléico para evitar los signos clásicos de la deficiencia, sin embargo, el requisito preciso para n-6 ácidos grasos no se ha determinado. Cerecedo et al. (1952) reportó que el 5 linoleato mg / día alivia los síntomas clínicos de la deficiencia de la EPT en tres cepas de ratones (C57, DBA, C3H) que se había convertido en la EPT con deficiencia de después de comer una dieta libre de grasas de más de 50 días después del destete. Las necesidades de n-6 de los ratones se desconocen, es probable que la exigencia sea mayor en los ratones jóvenes que están creciendo. La tasa de agotamiento del linoleato en el tejido es bifásica (Tove y Smith, 1959) con la pérdida más rápida que ocurre cuando linoleato formada por más de 20 por

ciento de los depósitos de grasa. Además, los ratones hembras y machos inmaduros perder linoleato más rápidamente que los machos adultos durante la más lenta, la segunda fase de agotamiento. El requisito de linoleato de ratones embarazadas y lactantes se desconoce, aunque se debe aumentar durante la lactancia que en la rata.

La recomendación anterior (National Research Council, 1978) fue del 0,3 por ciento linoleato la dieta, basada en la exigencia n-6 de la rata. Sin embargo, la presente recomendación para una dieta de la rata normal es de 0,68 por ciento de la dieta ME como linoleato, por lo tanto, la cantidad recomendada de ácido linoléico dieta de los ratones es de 0,68 por ciento. (7)

#### **1.10.4.2. Ácidos grasos n-3 (EFA).**

El ratón, como la rata, requiere ácido linoléico para evitar los signos clásicos de la deficiencia de la Educación para Todos, sin embargo, el requisito preciso para n-6 ácidos grasos no se ha determinado. Cerecedo et al. (1952) reportó que el 5 mg linoleato / día alivia los síntomas clínicos de la deficiencia de la EPT en tres cepas de ratones (C57, DBA, C3H) que se había convertido en la EPT con deficiencia de después de comer una dieta libre de grasas de más de 50 días después del destete. Las necesidades de n-6 de los ratones se desconocen, es probable que la exigencia sea mayor en los ratones jóvenes que están creciendo. (21)

La tasa de consumo de linoleato en el tejido es bifásica con la pérdida más rápida que ocurre cuando el linoleato forma parte de más de 20 por ciento de los depósitos de grasa. Además, los ratones hembras y machos inmaduros perder linoleato más rápidamente que los machos adultos durante la más lenta, la segunda fase de agotamiento. El requisito de linoleato de ratones embarazadas y lactantes se desconoce, aunque se debe aumentar durante la lactancia al igual que en la rata. (52)

La recomendación anterior (National Research Council, 1978) fue del 0,3 por ciento linoleato en la dieta, basada en la exigencia n-6 de la rata. Sin embargo, la presente recomendación para una dieta de la rata normal es de 0,68 por ciento de la dieta ME como linoleato, por lo tanto, la cantidad recomendada de ácido linoléico es de 0,68 por ciento de la dieta de los ratones.

#### **1.10.5. HIDRATOS DE CARBONO**

Típica dietas de hidratos de carbono proporcionadas a ratones contienen altas concentraciones de hidratos de carbono, a pesar de que las dietas que contienen no hidratos de carbono (83 por ciento de proteínas) han demostrado apoyar las tasas de crecimiento de 0,1 g/día de 4 a 16 semanas de edad en ratones normales (Leiter et al., 1983). En la alimentación de ratones donde se proporciona dietas con alto contenido de grasa (49 por ciento de grasa, 20% de proteína, carbohidratos de 15 por ciento) crecieron a tasas similares a las dietas de alta en carbohidratos (4 por ciento grasa, 20% de proteína, carbohidratos de 65 por ciento; 0,13 y 0,09 g/día, respectivamente; Robeson et al., 1981). Las tasas de crecimiento similares se observaron en ratones normales alimentados con dietas altas en carbohidratos ( $\geq 50\%$ ) en el que la glucosa, fructosa, sacarosa o almidón fueron la fuente principal de hidratos de carbono. (44)

Dietas con alta concentración de fructosa o sacarosa aumentaron la síntesis del ácido grasos del hígado y disminución de la síntesis de ácidos grasos extra hepática a diferencia de las dietas altas en glucosa o almidón (Herzberg y Rogerson, 1982).

#### **1.10.6. PROTEÍNAS**

#### **1.10.6.1. Crecimiento**

En los estudios revisados, ninguno utiliza las dietas de ingredientes naturales para estimar las necesidades de proteínas de ratones crecientes.

“Para ratones machos, las dietas purificadas apoyará a tasas de crecimiento de hasta 1,2 g/día para las 2 semanas siguientes del período post-destete. La dieta AIN-76 purificado dieta (American Institute of Nutrition, 1977), que contiene un 20 por ciento de caseína complementado con 0,3 por ciento DL-metionina, apoyará las ganancias de 0,98 a 1,2 g/día en las granjas Carworth N° 1 X de ratones suizos machos” (13) (Tabla N° 3 ). Otros (Maddy y Elvehjem, de 1949; Hirakawa et al., 1984; Toyomizu et al., 1988) con la CEPA suizos Y se han informado de ratones con tasas de crecimiento de 0,8 g/día, de 1 g/día y 1 a 1,1 g/día en cuando a dietas de caseína 19, 22,7 y 27 por ciento, respectivamente.

Mejorar el patrón dietético aminoácido al complementar la caseína con una cantidad equivalente de nitrógeno como una mezcla de aminoácidos indispensables disminuye la proteína necesaria para ratones de CD-1 que obtienen 1,3 g/día a 15,5 o el 16,5% de la dieta (Bell y Keith, 1992). Las hembras crecen más lentamente, y una concentración de proteínas es necesaria para maximizar el crecimiento. Se ha encontrado que una dieta que contiene caseína de 20 por ciento apoyaría una tasa de crecimiento de 0,73 g/día en ratones machos suizos, pero que el 14 por ciento apoyaría la tasa de crecimiento de 0,02 g/día en ratones hembra suizas. Por lo tanto, las dietas que contienen proteínas brutas de 18 por ciento, equivalente a un 20 por ciento caseína complementado con metionina o caseína solo al 23 a 27 por ciento de la dieta, las tasas de crecimiento de la asistencia de más de 1 g/día en ratones machos. (38)

#### **1.10.6.2. Reproducción**

**TABLA N° 3 REQUERIMIENTOS DE PROTEÍNA PARA EL CRECIMIENTO DE VARIAS CEPAS DE RATONES**

<b>Cepa</b>	<b>Sexo</b>	<b>Crecimiento , g/día</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Comentario</b>	<b>Referencia</b>
<b>Granja Carworth No. 1 X Suizo</b>	Macho	0.98	Caseína (20%) + DL-Met (0.3%)		Bell y John, 1981
<b>ICR</b>	Macho	1.0	Caseína (22.3%)		Hirakawa et al., 1984
<b>Suizo-STM</b>	Macho, Hembra	0.73, 0.57	Caseína	14% (Macho), 20% (Hembra)	Goettsch, 1960
<b>Suizo- Webster</b>	Macho	0.82	Caseína (19%)		Maddy yElvehjem, 1949
<b>Suizo- Webster</b>	Macho	0.93	20% caseína + 0.3% L-Cys		Reeves et al., 1993
	Hembra	0.71	20% caseína + 0.3% L-Cys		Reeves et al., 1993
<b>Y</b>	Macho	1.0-1.1	Caseína (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, y 100%)	Múltiple	Toyomizu et al., 1988
<b>Granja Carworth No. 1 X Suizo</b>	Macho	1.2 ± 0.05	Caseína (20%) + DL-Met (0.3%)	20%	Keith and Bell, 1989
<b>CD-1</b>	Macho	1.15-1.3	Caseína (56% de proteína cruda)		
	Macho	1.3	Caseína (20%) + DL-Met (0.3%)		
<b>A.- Los valores entre paréntesis son las cantidades del ingrediente, expresado como porcentaje de la dieta.</b>					

Fuentes: National Research Committee Council- 1998

Ambas dietas basadas en la caseína purificadas e ingredientes naturales se han utilizado en los estudios de la exigencia de proteínas para la reproducción y la lactancia. En un



estudio que se limita a la primera gestación y lactancia, una dieta que contiene caseína 16,7% resultó en la edad más baja en primer celo (30,5 días lugar de 36,7 días) y el mayor tamaño de la camada (7.5 versus 7.1), mientras una dieta que contiene caseína de 20 por ciento fue necesario para apoyar la lactancia, como lo demuestra el peso de la presa y la basura a los 21 días en ratones Suizos-STM (Goettsch, 1960).

Las dietas de ingredientes naturales variando en composición, pero que contengan proteínas brutas de 18 a 24 por ciento se han utilizado para evaluar la exigencia de proteína de ratones durante períodos de 6 a 9 meses (Bruce y Parkes, 1949; Hoag y Dickie, 1962) o más de cuatro a siete camadas para cinco cepas [BALB/cAnN, C3H/HeN, C57BL/6N, N: NIH (S) y DBA/2N] (Knapka et al., 1974, 1977). Aunque se observaron diferencias de cepas, un ingrediente natural de la dieta que contiene proteínas brutas de 18 por ciento apoya el tamaño de camada de seis a siete y un porcentaje de destete de 80 a 85 por ciento durante cuatro o cinco cachorros. Por lo tanto, las dietas de ingredientes naturales que contiene proteínas brutas de 20% por ciento de una mezcla de proteínas animales y vegetales satisfarán las necesidades de proteínas de ratones gestando/lactantes a través de varios embarazos (Knapka et al. 1974, 1977).

### **1.10.7. AMINOÁCIDOS**

#### **1.10.7.1. Crecimiento**

Las necesidades estimadas para un aminoácido dependen de las cantidades de otros aminoácidos en la dieta y la tasa de crecimiento. Con la excepción de D-lisina (Friedman y Gumbmann, 1981) y probablemente D-treonina, el aminoácido L-indispensable requisito puede cumplirse, en parte, por los D-aminoácidos. La eficiencia del uso de los D-aminoácidos individuales depende de la actividad (Konno y Yasumura, 1984) y la especificidad del D-amino oxidasa ácido (Konno et al., 1982), así como la cantidad y la distribución de otros aminoácidos d en la dieta debido a la competencia para la enzima

(Marrett y Sunde, 1965). Las tasas de crecimiento similares a los obtenidos con proteína intacto (0,7 a 1,0 g/día) se han obtenido con dietas de ácido L-amino en los estudios de crecimiento de 14 días. La concentración de los aminoácidos en estas dietas supera las necesidades estimadas (Consejo de investigación nacional, 1978) por 25 a 200 por ciento. (34)

Se han observado diferencias de crecimiento en el crecimiento potencial de las cepas. Ratones de la CEPA C57BL/6 ganaron 0,44 g/día, mientras que los ratones CD-1 ganaron 0,68 g/día (Olejer et al., 1982); y ratones de Suiza-Webster ganaron 0,4 g/día, mientras que la cepa de Rockland ganó 0,78 g/día (Maddy y Elvehjem, 1949). Pocos estudios se han centrado en la estimación de necesidades de aminoácidos de ratones (John y Bell, 1976; Bell y John, 1981).

El requisito de L-arginina sugiere ser menos del 0,1 por ciento para ratones ganando 0,8 g/día (Bell y John, 1981) y menos de un 0,3 por ciento para ratones ganando 0,9 g/día (John y Bell, 1976). Evidencia de informe de Milner et al. (1975) de deficiencia de arginina en ratones BFDSCH que ganó 0,4 g/día cuando alimentados con una dieta carente de L-arginina. Bauer y Berg (1943) encontraron que la arginina puede eliminarse de la dieta de ácido DL-amino de ratones ganando 0,11 g/día. Un nivel de 0,3 por ciento arginina deberá satisfacer los requisitos de ratones con un potencial de crecimiento de 1 g/día.

El requisito para L-histidina es 0,2% de la dieta para ratones, ganando más de 1 g/día (John y Bell, 1976). Olejer et al. (1982) mostró que el 0,1% se reuniría las necesidades de los ratones de C57BL/6 creciendo 0,4 g/día pero que 0,2% se requería para ratones CD-1, que creció de 0,7 g/día. L-carnosina en 0,29% puede reemplazar 0,2% L-histidina (Olejer et al., 1982). Parker et al. (1985) mostró que la supresión de L-histidina de la mezcla de aminoácidos dio lugar a la pérdida de peso y que la concentración de 0,33% L-histidina cumplen las necesidades de los ratones de Suiza-Webster ganando 0,3 g/día. El requisito

de L-histidina para ratones en crecimiento parece cumplirse en 0,2% de la dieta. El requisito de L-isoleucina es 0,4 por ciento de la dieta de ratones ganando 1,0 g/día (John y Bell, 1976). Las dietas que contienen el 0,7% y 0,5% L-leucina y L-valina, respectivamente (John y Bell, 1976), satisfacer las necesidades de los ratones crece 1 g/día; por lo tanto, estas concentraciones se establecen que los requisitos.

El requisito de L-treonina se establece en un 0,4 por ciento de la dieta ya que apoyará una ganancia de 1,1 g/día en Carworth granjas N° 1 X ratones suizos (John y Bell, 1976). El requisito de L-lisina de 0,4 por ciento de la dieta de ratones ganando 0,9 g/día (John y Bell, 1976) fue confirmada (Bell y John, 1981).

“El requisito de L-metionina es 0,5 por ciento de la dieta de ratones ganando 1 g/día (John y Bell, 1976). L-cisteína puede reemplazar tanto como la mitad a dos tercios de metionina en dietas de ratones ganando 1 g/día, y D-cisteína no escatimó L-metionina“(54). D-metionina puede tener un valor de hasta un 60% que de L-metionina en ratones ganando 1 g/día (Friedman y Gumbmann, 1984).

El requisito de L-fenilalanina de 0,4 por ciento de la dieta es compatible con el trabajo de John y Bell (1976) y Bell y John (1981). En las estimaciones de la exigencia de L-fenilalanina, L-tirosina dieta debe tenerse en cuenta como podrá sustituir hasta un 50 por ciento de L-fenilalanina (Friedman y Gumbmann, 1984b). Tasas de crecimiento de 1,2 g/día en Suiza-Webster ratones requieren 0,76 por ciento de L-fenilalanina o 0,38% L-fenilalanina + 0,38% L-tirosina (Friedman y Gumbmann, 1984b). D-fenilalanina tiene un crecimiento de promover el valor de una tercera parte de L-fenilalanina. Basado en la discusión anterior, el requisito de L-fenilalanina + L-tirosina se establece en un 0,76 por ciento de la dieta (donde L-tirosina podrá sustituir el 50% de L-fenilalanina). (32)

El requisito de L-triptófano de 0,1% de la dieta de ratones ganando 0,9 g/día (John y Bell, 1976) fue confirmada (Bell y John, 1981). MacEwan y Carpenter (1980) mostraban que la niacina 0,05% redujo el requisito de L-triptófano de 0,125% a 0,1% de la dieta en ratones C3HeJ ganando 0,7 g/día. Se mantiene el requisito de L-triptófano en 0.1 por ciento de la dieta. (11)

### 1.10.7.2. Reproducción

**TABLA N° 4 REQUISITOS DE AMINOÁCIDOS PARA EL CRECIMIENTO DE VARIAS CEPAS DE RATONES**

Cepas	Sexo	Crecimiento , g/día	Aminoáci do	% de dieta	Referencia
Granja Carworth No. 1 X Suizo	Macho	0.92	Arg at 40, 60, 80, 100, 120% del requerimient o de rata	≤0. 3	John y Bell, 1976
		1.08	His añadido a 5% caseína	0.2	
		1.00	Ile añadido a 5% caseína	0.4	
		1.10	Leu añadido a 5% caseína	0.7	
		0.93	Lys añadido a 5% caseína	≤0. 4	
		0.97	Met añadido a 5% caseína	0.5	
		1.15	Phe añadido a 5% caseína	≤0. 4	

		1.13	Thr añadido a 5% caseína	0.4	
		0.92	Trp añadido a 5% caseína	≤0.1	
		0.93	Val añadido a 5% caseína	0.5	
<b>Granja Carworth No. 1 X Swiss</b>	Macho	0.75	Arg 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, y 0.7%	<01	Bell y John, 1981 <sup>a</sup>
		0.87	Lys 0.4, 0.5, y 1.0%	0.4	
		0.90	Trp 0.10, 0.13, y 0.17%	0.1	
		0.81	Phe 0.3, 0.55, y 0.89%	0.4	
<b>ICR</b>	Macho	1.0	L-aminoácido mezclado, 16% de la dieta	—	Hirakawa et al., 1984
<b>Suizo-Webster</b>	Macho, Hembra	0.3–0.4	Mezclado 16% L- y DL-aminoácido	—	Maddy y Elvehjem, 1949
<b>Rockland</b>	Macho	0.7–0.78	Dieta 39 VII		Maddy y Elvehjem, 1949
<b>Suizo-Webster</b>	Macho	0.84	L-aminoácidos, 14.1%		Reicks y Hathcock, 1989
<b>C57BL/6</b>	Macho	0.44	L-aminoácido		Olejer et al., 1982

			s, 12.0%		
<b>CD-1</b>	Macho	0.68	L- aminoácidos, 12.0%		Olejer et al., 1982
<b>C3HeJ</b>	Macho	0.7	Caseína (6%) + gelatina (6%) ± 0.065% D- o L-Trp ± 0.05% niacina		MacEwan y Carpenter, 1980
<b>Suizo-Webster</b>	Macho	1.0–1.1	Dieta de L- aminoácidos	—	Friedman y Gumbman, 1984a,b
	Macho	1.1	0.59% L- Met	—	
			0.29% L- Met + 0.29% L- Cys	—	

**a.- Basado en proteínas purificadas.**

No se encontraron estudios acerca de los requisitos estimados de aminoácidos para la gestación y la lactancia. Concentraciones similares a los de la lista para el crecimiento pueden esperarse para cumplir los requisitos para la gestación. Las concentraciones más altas pueden ser necesarias para la lactancia.

**Fuentes:** Bell, J. M., y A.-M. John-1981 (11)

## 1.10.8. MINERALES

### 1.10.8.1. Calcio y fósforo

Informes con respecto a los requisitos de calcio y fósforo cuantitativos de los ratones no han sido publicados; por lo tanto, las necesidades estimadas para estos minerales se basan en las concentraciones de dietarios que han dado lugar a un rendimiento aceptable en los ratones. Dietas purificadas que contienen 4.0 g Ca/kg y 3 a 12 g P/kg dieta (Morris y Lippincott, 1941; Mirone y Cerecedo, 1947), 5.0 g Ca/kg dieta (Wolinsky y Guggenheim, 1974) y 8.0 g Ca/kg de la dieta y 4.0 mg P/kg dieta (Bell y Hurley, 1973) han demostrado para apoyar el crecimiento y reproducción en ratones. Las dietas de ingredientes naturales que contiene 12 g/kg de entidad emisora de certificados y 8,6 g P/kg (Knapka et al., 1974, 1977) también se han reportado para apoyar el crecimiento y reproducción en BALB/cAnN, C57BL/6N, N:NIH (S), C3H/gallina y ratones DBA/2N.

Limitación de fósforo dietética a 3.0 g P/kg parece promover la calcificación de hueso en ratones. Bell et al. (1980) encontró que ratones hembra de B6D2F1 las mayores concentraciones de calcio y fósforo en sus huesos cuando alimentadas con alimentación de Ca/kg de g 6.0 con 3.0 g P/kg dieta que cuando alimentado 6.0 a 24,0 g Ca/kg de la dieta con 12.0 g P/kg. Trabajos posteriores demostraron que los ratones hembra de B6D2F1 crecieron mejores cuando se alimentaron con 15 por ciento caseína con 6.0 g/kg de entidad emisora de certificados y 3.0 g P/kg dieta (dieta basal) que cuando una proteína 15% o 30 por ciento alimentada con 6.0 g/kg de entidad emisora de certificados y 12,0 g P/kg de la dieta (Yuen y Draper, 1983). Por otra parte, las concentraciones de calcio del hueso fueron más altas cuando ratones alimentados con la dieta basal que cuando ellos se alimentan con las dietas que contienen concentraciones elevadas de fósforo.

Poco se ha escrito sobre el problema de la nefrocalcinosis en ratones. Sin embargo, Yuen y Draper (1983) observaron que las concentraciones de calcio en los riñones de ratones de B6D2F1 más que duplicaron cuando fósforo dietético se incrementó de 3.0 g P/kg a 12.0 g P/kg y proteína se celebró constante en 15 por ciento de la dieta. Esto sugiere que el exceso de fósforo en la dieta tiene los mismos efectos negativos en ratones como en ratas; y en cuanto al calcio, no hay ninguna prueba que indique que los requisitos de

calcio son mayores para ratones que las ratas. Por lo tanto, la dieta de 5,0 g Ca/kg y 3.0 g P/kg dieta se estiman como los requisitos para la rata son también las necesidades estimadas para el ratón.

Signos de deficiencia de calcio y fósforo Wolinsky y Guggenheim (1974) y Ornoy et al. (1974) informaron que ratones suizos al consumir una dieta que contenga sólo 0,2 g Ca/kg experimentan disminución de peso, ceniza de hueso y calcio sérico. Estos efectos fueron mucho menos marcados en ratones que en ratas, sin embargo. Ratones aumentaron la concentración de proteína de enlace de calcio en la mucosa duodenal y reducción crecimiento esquelético. Disminución de crecimiento, en lugar de osteoporosis era la señal más prominente de deficiencia. (18)

#### **1.10.8.2. Magnesio**

El magnesio ha demostrado ser esencial en una dieta para ratones, pero no se ha establecido la ingesta óptima para esta especie. Alcock y Shils (1974) informó que ratones con alimentación que contiene 20 mg Mg/kg dieta desarrollado signos de deficiencia de las dietas, pero estos signos no se desarrolló cuando la dieta incluye 400 mg Mg/kg de dieta. Fahim et al. (1990) informó que los ratones alimentados con una dieta que contenga 111 mg Mg/kg de dieta crecieron más lentamente y había una concentración de magnesio en su suero ratones alimentados con una dieta que contenga 335 mg Mg/kg de dieta. Una dieta purificada que contenga 730 mg Mg/kg de dieta apoyó el normal crecimiento y desarrollo de ratones (Bell y Hurley, 1973). Dubos et al. (1968) informó de la muerte súbita en ratones lactantes alimentados con una dieta que contiene 500 mg Mg/kg de dieta, pero no en los ratones alimentados con una dieta que contenga 700 mg Mg/kg. Esto es paralela a la conclusión de las ratas (Hurley et al., 1976) que el requisito de magnesio para la lactancia es superior a la de crecimiento. (1)



Dietas de ingredientes naturales que contengan 1.800 y 2.600 mg Mg/kg de dieta para el buen crecimiento y reproducción en tres cepas de ratón (Knapka et al., 1974). La dieta de la concentración en el ampliamente utilizado AIN-76 (Instituto estadounidense de nutrición, 1977) purificado de magnesio es 500 mg/kg. Dado que los datos relativos a los requisitos de magnesio cuantitativos para ratones son inconsistentes y no definitiva, 500 mg Mg/kg de dieta es las necesidades estimadas para esta especie, y la exigencia de lactancia puede ser tan alta como 700 mg/kg, al menos para algunas cepas. Signos de deficiencia de magnesio Alcock y Shils (1974) informaron de ratones con deficiencia de magnesio desarrollaron convulsiones rápidas y generalmente fatales sin hiper irritabilidad anterior. Calcificación de tejidos blandos, resultante de la deficiencia de magnesio se reportó en una cepa de ratón KK hereditariamente diabética.

#### **1.10.8.3. Potasio**

“Bell y Erfle (1958) encontraron que ratones (Granjas Carworth N° 1) alimentados con dietas purificadas con concentraciones de potasio de 2,0 g/kg de dieta no presentan signos de deficiencia de potasio, tales como crecimiento deficiente, presencia de inanición, ojos secos, cabello y colas escamosas. Una dieta de ingredientes naturales que contenga 8.2 g K/kg de dieta (Knapka et al., 1974) y una dieta purificada que contenga 8,9 g K/kg de dieta (Bell y Hurley, 1973) apoyaron el buen crecimiento y reproducción en ratones. Basándose en estos resultados, la concentración estimada necesaria para ratones es 2,0 g K/kg de dieta”. (15)

#### **1.10.8.4. Sodio, cloruro de sodio**

“Los requisitos para ratones no han sido estudiados. Se conocen dos dietas de ingredientes naturales que contienen 4,9 y 3,6 g/kg de Na (Knapka et al., 1974) y una dieta purificada que contenga 3,9 g Na /kg de dieta (Bell y Hurley, 1973) para apoyar la reproducción y buen crecimiento. Sin embargo, la exigencia estimada de sodio y cloruro

es 0,5 g Na/kg de dieta y 0,5 g Cl/kg de dieta, que es idéntica a la que se estima para ratas. Los requisitos reales pueden ser inferiores para ratones. Los ratones también tienen menos probabilidades que las ratas de ingerir soluciones salinas”. (2)

#### **1.10.8.5. Cobre**

No se han publicado estudios específicos para determinar el requisito de cobre de ratones cada vez más jóvenes. Knapka et al. (1974) informó del crecimiento satisfactorio y reproducción por una dieta de ingredientes naturales que contenga 16 mg Cu/kg de dieta. Hurley y Bell (1974) informaron adecuado crecimiento y desarrollo en ratones jóvenes cuando ellos fueron alimentados con una dieta purificada que contiene 4, 5 mg Cu/kg de dieta. Mulhern y Koller (1988) mostró que ratones machos y hembras destete de C57BL/6J alimentación con una dieta purificada basada en huevo-glucosa, que contiene 2 mg de Cu/kg de dieta manteniendo los valores de la actividad de celuloplasmina de suero y respuesta inmune para 8 semanas que no fueron significativamente diferentes de los ratones alimentan con dietas que contiene 6 mg Cu/kg de dieta; Sin embargo, 1 mg/kg, no fue suficiente.

Técnicas de modelado no lineal de Reeves y otros (1994) utilizados para estimar el requisito de cobre de ratones Suizos-Webster machos adultos alimentados con la dieta purificada AIN-93. Alimentando a los ratones con una gama de cobre, de 0,8 y 6.5 mg/kg de la dieta durante 12 semanas, estimaron que eran necesario mínimo concentraciones dietéticas de 2,5 y 4 mg/kg de Cu de dieta para mantener la máxima concentración de cobre de suero y actividad de celuloplasmina de suero, respectivamente. Sin embargo, en otras condiciones ambientales y dietéticas el requisito de cobre para ratones machos adultos podría ser más de 4 mg/kg de dieta.

Basándose en estos resultados limitados, el requisito mínimo estimado de ratones inmaduros y adultos se establece en 6 mg Cu/kg de dieta. No hay información disponible

acerca de los requisitos para el embarazo y la lactancia. Sin embargo, debido a la similitud entre las necesidades estimadas para el cobre en ratas jóvenes (Johnson et al., 1993; Klevay y Saari, 1993) y ratones adultos (Reeves et al., 1994), las necesidades estimadas para el embarazo y la lactancia en ratones es similar de las ratas; 8 mg Cu/kg de dieta. Altas concentraciones de dietarios de cinc, cadmio y ácido ascórbico pueden aumentar la exigencia dietética de cobre. (31)

La deficiencia de cobre ratones tienen bajas concentraciones de cobre en plasmas, baja actividad de celular en plasma, anemia, corazones ampliada, metabolismo alterado catecolaminas, timo y atrofia del bazo y concentraciones de baja hepático citocromo P450. (8)

Ratones son relativamente resistentes a intoxicaciones de cobre. Ratones embarazadas y alimentadas con dietas que contenga 2.000 mg dieta de Cu/kg a lo largo de la gestación no llevan a los cachorros a término; Cuando la dieta alta en cobre se limitaba a los días 7 y 12 de gestación, la frecuencia de reabsorción fue superior al 50 por ciento y fetos supervivientes fueron normales. Toxicidad Cu en la dieta a los embriones al parecer fue causada por un efecto indirecto de la ingesta de alimentos reducidos más que por un efecto directo del exceso de cobre en el feto (Keen et al., 1982).

#### **1.10.8.6. Hierro**

Sorbie y Valberg (1974) informaron que las concentraciones de hierro de 25 a 100 mg/kg de Fe de dieta apoyaron el crecimiento normal y extra medular en ratones machos de C57BL/6J, aunque, almacenamiento de hierro hepática en estos animales fue baja en comparación con los ratones alimentación dietas naturales-ingrediente que contenga entre 220 a 240 mg de Fe/kg de dieta. Cuando la concentración de hierro en la dieta se incrementó a 120 mg de Fe/kg de dieta, hígado de hierro fueron similar a los obtenidos

con la dieta de ingredientes naturales. La dieta de 120 mg de Fe/kg apoya la buena reproducción durante tres generaciones. (51)

Se establece el requisito de hierro en la dieta de 35 mg/kg, basada en la concentración en la dieta purificada ampliamente utilizada, AIN-76 (Instituto estadounidense de nutrición, 1977). Las concentraciones más altas pueden ser necesarias para la reproducción. Dos de las dietas de ingredientes naturales conocidas para proporcionar buena salud y reproducción en tres cepas de ratón contenían entre 198 y 255 mg Fe/kg de dieta (Knapka et al., 1974).

“Los signos de deficiencia de hierro en comparación con controles alimentados con una dieta que contenga 122 mg Fe/kg, machos de CD-1 de ratones alimentación con una dieta baja de hierro (2 mg/kg de Fe) por 30 días se caracterizaron por peso corporal baja, anemia y suprimidos de linfocitos T-dependiente funciones asociadas a la producción de anticuerpos y blastogénesis” (20). Kuvibidila et al. (1990) informó de similares células T anormales en ratones hembra de C57BL/6 alimentación con dietas bajas en hierro (10 mg/kg de Fe) por 40 días; Además, estos investigadores observaron una reducción en las poblaciones de células b maduras.

Signos de toxicidad NMR1 de hierro en alimentación de ratones con dietas altas en hierro (entre 0,5 y 3,5% Fe-fumarato) para 4 semanas se caracterizaron por dependientes de la concentración de hierro aumentando las concentraciones de hierro en el hígado en dos puntos y la peroxidación de lípidos de tejido (Younes et al., 1990).

#### **1.10.8.7. Manganeso**

Las concentraciones de manganeso de dieta de 3 mg/kg o menos son claramente insuficientes para un óptimo crecimiento y el desarrollo de varias cepas de ratón,

mientras que las dietas que contengan 45 a 50 mg Mn/kg de dieta son adecuadas para todos los criterios probados (Hurley y Bell, 1974; Hurley y Keen, 1987). El consumo en las dietas es de 5 mg Mn/kg a lo largo de la gestación y la lactancia. Dada la falta de datos que apoyan un requerimiento dietético de manganeso de dieta de 5 mg/kg, el requisito estimado de manganeso se ha establecido a 10 mg/kg de dieta para tener en cuenta las posibles diferencias entre distintas cepas. Esto es más baja que la recomendación de NRC de 1978 de la dieta de 45 mg/kg y refleja la ausencia de datos apoyar la necesidad de una alta concentración de manganeso junto con los posibles efectos negativos del exceso de manganeso en el metabolismo del hierro. (32)

La deficiencia de manganeso durante el desarrollo prenatal puede resultar en la ataxia irreversible congénita, que se caracteriza por la falta de equilibrio y de la retirada de la cabeza. La ataxia es causada por un desarrollo anormal de los otolitos (Erway et al., 1970. Hurley y Keen, 1987). La deficiencia de manganeso prenatal puede resultar en una mayor frecuencia de la temprana muerte después del parto, aunque peso al nacer y aumento de peso de cuerpo postnatal temprana no son típicamente afectadas (Hurley y Bell,) de 1974. Descendencia que se alimentó con las dietas en deficiencia de manganeso en vida posterior puede mostrar anomalías y hígado graso y obesidad, incluida su integridad alterada de la células y membranas mitocondriales, lo que pueden estar vinculadas en parte a alteraciones en el sistema de defensa de radicales libres. (16)

#### **1.10.8.8. Zinc**

“Mediante el peso corporal, la concentración de cinc en los tejidos, y respuesta a la inmunización como criterios, en el destete y en ratones adultos alojados individualmente en jaulas de acero inoxidable de alambre tienen un requisito de zinc en la dieta del orden de 10 mg/kg de dieta cuando se utiliza huevo o caseína como la fuente principal de proteínas” (45). “El requisito es mayor cuando se utiliza la proteína de soja (» 20 mg/kg), presumiblemente debido a su alto contenido de ácido fítico (playa et al., 1980). No se han establecido requisitos precisos para el embarazo y la lactancia. Se ha reportado una

concentración de 5 mg Zn/kg de dieta parece ser insuficiente (playa et al., 1982,), mientras que la reproducción satisfactoria ha sido demostrada mediante dietas que contenían en la dieta 30 mg Zn/kg o más". (9)

Basándose en estos resultados, la exigencia de zinc estimado en la dieta de ratones adultos y en crecimiento es la dieta de 10 mg/kg y para las hembras embarazadas y lactantes presas es la dieta de 30 mg/kg. El requisito de dieta de zinc puede verse influido por vivienda condiciones; por ejemplo, mantenidos en jaulas galvanizados, en jaulas con un fondo sólido o en grupos de ratones tienen un requisito inferior de zinc "dietéticas" porque el zinc está disponible en las heces y materiales de la jaula.

Signos de deficiencia de Zinc, una ingesta inadecuada de zinc se caracteriza por la marcada reducción de zinc de plasma, que ocurren dentro de unos días (Peters et al., 1991), seguida de la anorexia de leve a severa posterior. Consumo prolongado de una dieta deficiente en cinc puede producir retardo/retraso en el crecimiento, la alopecia, atrofia de tejido linfóide, deterioro significativo de varios componentes del sistema inmunológico y alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas. La introducción de una dieta de deficiencia de cinc durante el embarazo puede dar como resultado graves patologías embrionarias y fetales, incluidas la muerte prenatal y una alta incidencia de sistema nervioso central, tejidos blandos y defectos esqueléticos y anomalías de comportamientos después del parto.

Signos de toxicidad de Zinc, en ratones son relativamente resistentes a intoxicaciones; de zinc Aughey et al. (1977) no informó de ningún efectos significativos asociados con las donaciones de 500 mg Zn/L de agua hasta 14 meses.

#### **1.10.8.9. Iodo, Selenio y Molibdeno**

Han demostrado efectos negativos sobre el estado fisiológico o bioquímico de mamíferos si la dieta es personas con yodo, selenio y molibdeno. El cobalto es esencial, pero sólo como parte de la vitamina B12. Sin embargo, no ha logrado ningún esfuerzo sistemático para establecer los requerimientos de molibdeno para el ratón, selenio y yodo.

La deficiencia de yodo se produjo en ratones por ellos alimentación dietas que contiene 20  $\mu\text{g I / kg}$  de dieta durante 8 semanas (muchos et al., 1986). Estos ratones experimentados agrandamiento de las glándulas tiroides en comparación con controles alimentados 200  $\mu\text{g I / kg}$  de la dieta. La deficiencia de yodo marginal fue producida en ratones que consumieron dietas con 42  $\mu\text{g I / kg}$  (Van Middlesworth, 1986). Ratones eran capaces de adaptarse a una ingesta baja en yodo mediante el mantenimiento de las concentraciones normales de yodo en la tiroides. Cuando ellos fueron amenazados con una micotoxina, sin embargo, la concentración de yodo disminuyó. No hubo efectos de la toxina en el contenido de yodo de tiroides en ratones alimentados con 150  $\mu\text{g I / kg}$  de dieta.

Hay una serie de informes sobre la producción de la deficiencia de selenio en ratones. La cantidad de selenio dietético que provocó una considerable reducción en la actividad de hígado de glutatión peroxidasa osciló entre 10 y 16 de  $\mu\text{g/kg}$  de dieta. Ratones de control en estos estudios fueron alimentados de selenio que van desde 330 a 500  $\mu\text{g Se/kg}$  de dieta (Wendel y Otter, 1987; Otter et al., 1989; Toyoda et al., 1989; Weitzel et al., 1990; Peterson et al., 1992).

Basándose en estas obras, parece razonable que sugieren que podría ser el requisito mínimo de selenio y yodo para que el ratón al menos tanto como para la rata. Datos para los requerimientos de molibdeno del ratón son aún más escasos que los de selenio o yodo, y se sugiere que los valores establecidos para la rata son buenas estimaciones para el ratón. (2)

### **1.10.9. VITAMINAS**

#### **1.10.9.1. Vitamina A**

Se ha demostrado por Wolfe y Salter (1931) que la vitamina A es requerida por el ratón, el ratón se ha utilizado ampliamente en los estudios del metabolismo de la vitamina A y del papel de la vitamina A en la prevención del cáncer. Sin embargo, poco se ha hecho para establecer la obligación de vitamina A de ratones, y el agotamiento en el ratón de sus niveles de vitamina A (McCarthy y Cerecedo, 1952). Si se desea el rápido agotamiento, es necesario utilizar las crías de una hembra embarazada, alimentados con una dieta de deficiencia de vitamina A, desde el día 10 de gestación; Esto producirá niveles de muy bajo vitamina A en los cachorros (Smith, 1990). Ratones jóvenes destetados de presas alimentados con una dieta estándar pueden requerir hasta un año para mostrar signos manifiestos de deficiencia. Santhanam et al. (1987) han explorado métodos para producir lentamente la deficiencia de vitamina A en ratones. Tanto BALB/c y ratones suizos desarrollaron signos de deficiencia cuando alimentados con una dieta basada en grano de cereales calculada para que contenga vitamina a 1200 IU/kg (aproximadamente equivalente a la dieta de retinol/kg  $\mu\text{mol}$  1,2). Ratones BALB/c mantienen buena salud, mostraban un buen crecimiento y almacenan modestas reservas hepáticas de ésteres de retinol cuando son alimentados con una dieta calculada para contener 2.400 IU vitamina A/kg (2,5  $\mu\text{mol/kg}$ ). La dieta de AIN-76 se formuló para contener 4.000 IU vitamina A/kg ( $\mu\text{mol}$  4,2 retinol ésteres/kg). Esta dieta ha sido adecuada para el crecimiento normal y reproducción en ratones (Instituto Americano de la nutrición, 1977). (50)

Cuando se alimentó con dietas de ingredientes naturales que contenía 13.371 IU / kg (aproximadamente 14  $\mu\text{mol/kg}$ ), a la dieta de ratones se encontraron que acumulaban reservas de vitamina A en sus hígados como aumentaron de 9 a 216 días de edad (Sundboom y Olson, 1984). Sin embargo, en el día 644 de edad en ratones se ha comprobado que tienen sobre la mitad de la vitamina hepática.



Basándose en estos datos limitados, el requisito de vitamina A (retinol) del ratón parece ser similar a la exigencia de la rata. Por lo tanto, una dieta concentración de 2.400 IU/kg de dieta (2,5  $\mu\text{mol/kg}$  de dieta; 0,72 mg/kg de dieta) es suficiente para satisfacer los requerimientos del ratón.

Idealmente, los ésteres de retinol deben agregarse a dietas de animales en capsulas de gelatina estabilizada, que protegerá la vitamina A de oxidación. Un procedimiento alternativo consiste en disolver lentamente los ésteres de retinol en los lípidos dietéticos, que contiene un antioxidante, antes de que los lípidos se mezclen con la dieta. Si se utiliza el segundo procedimiento, la dieta debe prepararse al menos cada dos semanas. Disolución de los ésteres de retinol en un disolvente y agregarlas directamente a los demás componentes de la dietarios sin la protección ofrecida por los aceites de dietarios o por gelatina dará como resultado la destrucción oxidativa sustancial de la vitamina. El almacenamiento y tratamiento de la dieta son también muy importantes. Zimmerman y Wostmann (1963) informaron que la actividad de vitamina A se redujo en un 20 por ciento como resultado de la esterilización de vapor.

“Signos de deficiencia de vitamina A, una de las consecuencias de principios y significativas deficiencias de vitamina A es el deterioro del sistema inmunitario funcional. Si las condiciones son sanitarias el principal signo abiertamente observado a principios de la deficiencia es una disminución de la tasa de aumento de peso. A medida que la deficiencia progresa muchos tejidos epiteliales convirtiéndose en tejidos queratinizados, los de las vesículas seminales, testículos, incluidos vejiga, riñón, tráquea, esófago, glándulas salivales y los pulmones (McCarthy y Cerecedo, 1952)”. (46)

Signos de toxicidad de vitamina A, los estudios de toxicidad de vitamina A en ratones se centraron en los aspectos teratógenos de la toxicidad. Kochhar et al. (1988) han encontrado que una dosis única de 349  $\mu\text{mol/kg}$  BW día 10,5 de gestación produjo

paladar hendido y deformidades de la extremidad en ratones ICR. Una dosis menor de 175  $\mu\text{mol/kg}$  BW no produjo las deformidades. Giroud y Martinet (1962) informaron que las tres dosis de 6,5  $\mu\text{mol}$  vitamina A/kg BW en los días 8, 9 y 10 de gestación que causó la muerte o la reabsorción de 63 por ciento de los fetos y malformaciones en otros.

#### **1.10.9.2. Vitamina D**

La dieta de AIN-76 se formuló para contener la colecalciferol 0,025 mg/kg (0,65  $\mu\text{mol}$  o 1.000 IU/kg) (Instituto estadounidense de nutrición, 1977). Esta cantidad de vitamina D es adecuada y puede representar un exceso considerable. Sin embargo, no se recomienda una cantidad menor hasta que el criterio más sensible del Estado de la vitamina D se ha evaluado a entradas de inferiores.

“Signos de deficiencia de vitamina D, el ratón es muy resistentes al desarrollo de raquitismo, una enfermedad causada por la deficiencia de vitamina D. Barba y Pomerene (1929) encontraron que los ratones alimentación signos de deficiencia de vitamina D en la dietas desarrollaron raquitismo dentro de 7 a 14 días. Raquitismo sanado espontáneamente entre los días 20 a 27 sin administración de suplementos de vitamina D, pero la osteoporosis estaba presente en muchos de los animales después de la cura. Por el contrario, la producción de leche y el contenido de calcio de la leche fueron normales en CD-1 ratones alimentados con una dieta de deficiencia de vitamina D”. (6)

“Signos de la DL50 de toxicidad de vitamina D, de una única inyección intraperitoneal de colecalciferol para ratones CF1 resultó para ser 355  $\mu\text{mol/kg}$  BW (Hatch y Laflamme, 1989). No se ha encontrado ninguna toxicidad después de la inyección de 104  $\mu\text{mol/kg}$  ( $1,7 \times 10^6$  IU / kg). Por el contrario, sólo 5,5 nmol 1,25-dihydroxycholecalciferol/kg fue necesario para producir toxicidad en ratones C57BL/6J”. (29)

### 1.10.9.3. Vitamina E

“Bryan y Mason (1940), observó la resorción fetal en la deficiencia de vitamina E en ratones hembras similares a la que observó en ratas, pero no observó ninguna evidencia de lesión testicular en los machos con deficiencia de vitamina E. Informaron de que la administración de 81 nmol de mezcla racémica- $\alpha$ -tocoferol diariamente para los diez primeros días de gestación era suficiente para mantener el primer embarazo” (23). “Esto corresponde a una concentración dietética de dieta de 10 IU RRR- $\alpha$ -tocoferol/kg (15,7  $\mu$ mol/kg). Goettsch (1942) encontró que una sola dosis de vitamina E equivalente a 1,8 IU a 2.4 de IU RRR- $\alpha$ -tocoferol (1,16 a 1,55  $\mu$ mol) en el inicio de la gestación era suficiente para mantener el embarazo en ratones entre 3 y 6 meses de edad. Ratones de 7 a 12 meses de edad requieren una mayor dosis equivalente a 5 IU RRR- $\alpha$ -tocoferol ( $\mu$ mol 7,78) para mantener el embarazo” (37). Trostler et al. (1979) encontró que en ratones machos C57BL/6J alimentados con una dieta que contiene el equivalente de 62  $\mu$ mol dieta RRR- $\alpha$ -tocoferol/kg (no utilizar la dosis más baja) tenían una tasa de crecimiento igual o superior a la observada con ratones alimentados con 124 de  $\mu$ mol/kg de dieta. Sin embargo, más de 124 de  $\mu$ mol/kg de dieta es necesario para evitar la acumulación de malondialdehído en el hígado y el tejido adiposo. Yasunaga et al. (1982) dio inyecciones diarias de intraperitoneal de mezcla racémica- $\alpha$ -tocoferol a ratones BALB/c y midió su respuesta a mitógenos. Se obtuvieron las mejores respuestas en ratones inyectados con cantidades equivalentes a 7,8 a 28  $\mu$ mol BW RRR- $\alpha$ -tocoferol/kg. La dosis inferior es equivalente a 50  $\mu$ mol dieta RRR- $\alpha$ -tocoferol/kg. Basados en estos datos el requisito de la vitamina E para ratones en la dieta se estima en 22 mg/kg o IU 32/kg RRR -  $\alpha$ -tocoferol/kg (50  $\mu$ mol/kg de dieta) cuando los lípidos constituyen menos del 10 por ciento de la dieta. Cuando la mezcla racémica- $\alpha$ -tocoferol acetato se utiliza como el origen de la dieta, el importe equivalente sería 32 mg/kg de dieta.

Signos de distrofia muscular y degeneración hialina en ratones con deficiencia de vitamina E, pero en una menor incidencia se observó en las ratas. No las lesiones fueron encontradas en el sistema nervioso central. Davies y otros (1987) no encontraron una acumulación de lipofuscina en tejidos nerviosos. El único tejido para mostrar

acumulación de lipofuscina en la deficiencia de vitamina E fue el hígado. Espermatoogénesis mantuvo activa en ratones de deficiencia de vitamina E hasta 439 días. (30)

Signos de toxicidad de vitamina E, Yasunaga (1982) encontraron que ratones machos C3H / de él les inyecta por vía intraperitoneal diariamente  $\mu\text{mol}$  212 mezcla racémica -  $\alpha$ -tocoferol/kg BW mostró una pérdida de peso por día 7. Las inyecciones de 846  $\mu\text{mol}$ /kg PC/día fueron letales. El  $\alpha$ -tocoferol quinona, es un metabolito principal de  $\alpha$ -tocoferol, se ha encontrado que interfiere con la capacidad del ratón para metabolizar la vitamina K y dio lugar a hemorragias (Woolley, 1945).

#### **1.10.9.4. Vitamina K**

“La vitamina K no ha sido considerado esencial para ratones criados en condiciones convencionales debido a la importante contribución de la COPROFAGÍA. Sin embargo, con el aumento en el uso de animales libres de agente patógeno específico para la investigación, esto probablemente ya no es cierto. Tanto en ratones libres de agentes patógenos específicos CF1 (Fritz et al., 1968) y ratones libres de gérmenes ICR/JCL (Komai et al., 1987) se reportaron que mueren rápidamente de diátesis hemorrágica cuando son alimentados con dietas libres de vitamina K” (5). “Adición de 16  $\mu\text{mol}$  menadiona/kg a la dieta previene problemas hemorrágicos en los ratones libres de agentes patógenos específicos. No se han realizado estudios utilizando el criterio más sensible del Estado de la vitamina con ratones como lo han sido con ratas” (43). Por lo tanto, las necesidades estimadas de la vitamina K para ratones es 1 mg filoquinona /kg de dieta (2,22  $\mu\text{mol}$ /kg de dieta), basada en los requerimientos de la rata.

#### **1.10.9.5. Vitamina B12**

Las bacterias intestinales en ratones sintetizan indeterminadas cantidades de vitamina B12. La presencia endógena de vitamina B12 generalmente confunde los intentos para determinar los requisitos cuantitativos de esta vitamina para ratones. Jaffé (1952), sin embargo, informó que un requisito de vitamina B12 en exceso de 5 µg/kg de dieta para el crecimiento y entre 4 y 5 µg/kg de dieta para la reproducción y la lactancia. Lee et al. (1962) demostraron que los ratones requieren vitamina B12 para la gestación. La dieta de uso generalizado de la AIN-76 (Instituto Americano de la nutrición, 1977) purificado que contiene 10 µg/kg de vitamina B12 no ha resultado en cualquier informe de signos de deficiencia de vitamina B12. Esto indica que la concentración de vitamina B12 en las dietas de AIN-76 es adecuada para ratones. En ausencia de datos más recientes y definitivas con respecto a los requisitos de la vitamina B12 para ratones, 10 µg vitamina B12 /kg de dieta es el requisito estimado para esta especie. Sin embargo, cabe señalar que una concentración dietética puede ser adecuada para ratones con la flora intestinal convencional, pero las mayores concentraciones puede requeridas cuando la disponibilidad de B12 endógena es limitada bajo condiciones tales como la alimentación con antibióticos, ambientes libres de germen o prevención de COPROFAGÍA.

Signos de deficiencias de vitamina B12 de ratones jóvenes la deficiencia de vitamina B12 muestran crecimiento retardado y atrofia renal (Lee et al., 1962). Deficiencia causa la muerte tanto antes como después del nacimiento.

#### **1.10.9.6. Biotina**

En contraste con otras especies de roedores, los ratones alimentados con dietas purificadas basadas en la caseína parecen tener un requisito de biotina que excede la cantidad obtenida de COPROFAGÍA. Varios investigadores han observado signos de deficiencia de biotina o aumento de peso debajo del nivel óptimo cuando ratones fueron alimentadas con dietas de la deficiencia de biotina (Nielsen y negro, de 1944; Fenton et al., 1950; Lakhanpal y Briggs, 1966). Fenton (1950) encontraron que 0.823 µmol biotina/kg dieta era suficiente para que el ratón, pero no usaron otras concentraciones. La

dieta de AIN-76 se formuló para contener 0,2 mg biotina /kg de dieta (0,82  $\mu$ mol biotina/kg). En ausencia de datos más recientes y definitivos con respecto a las necesidades dietéticas de ratones, la concentración de 0,2 mg/kg de biotina en la dieta es la concentración estimada, siendo segura y adecuada.

Signos de deficiencia de biotina; Watanabe de y Endo (1989, 1991), se observado efectos teratogénicos de la deficiencia de biotina en ratones alimentados con una dieta de huevo atomizado. Los efectos teratogénicos fueron mucho más severos en las cepas ICR y C57BL/6N de rápido crecimiento que en los ratones A/Jax de más lento crecimiento. Los otros signos de deficiencia son la alopecia, retraso en el crecimiento, así como disminución de la eficiencia de reproducción y lactancia. (48)

#### **1.10.9.7. Colina**

La Colina fue reconocida primero como esencial en la dieta para el mejoramiento del ratón, se ha observado que el hígado graso en ratones se debe a la deficiencia de colina. Ya que se puede sintetizarse colina de metionina y su metabolismo está influenciado por el ácido fólico y vitamina B12, un requisito mínimo para colina es difícil de establecer.

Meador y Williams (1957) encontraron que ratones alimentados con una dieta que contiene 80 g caseína/kg y 400 g manteca de cerdo/kg requería 5 g de colina cloruro/kg de dieta (35.800  $\mu$ mol/kg) para apoyar el crecimiento y prevenir la acumulación de lípidos en el hígado. Sin embargo, Williams (1960) encontró que este nivel de colina tiende a ser tóxico en estudios a largo plazo. Por lo tanto, deben ser prudentes en la adición de las altas concentraciones de colina a la dieta. La dieta de AIN-76 ampliamente utilizada se formuló para contener 2 g bitartrato de colina /kg de dieta (7.900  $\mu$ mol/kg), esta cantidad proporciona una concentración adecuada de colina para las dietas que contienen las concentraciones óptimas de metionina. Por lo tanto, 2 g colina bitartrato/kg de dieta (7.900  $\mu$ mol/kg) es la concentración de dieta estimada como segura y adecuada.

“Signos de deficiencia de colina en ratones; la deficiencia de la colina en ratones estos tenían hígado graso con hiperplasia parenquimatosa modular y tasas más bajas de concepción con baja viabilidad de los jóvenes” (45). “En contraste con las descripciones anteriores de fibrosis, Rogers y MacDonald (1965) observaron que los ratones C57BL, a diferencia de las ratas, no se desarrolló cirrosis o la fibrosis del hígado, pero sólo hígado graso. Existen inflamaciones agudas y crónicas sobre la necrosis de las células hepáticas individuales. Proliferación de las células parenquimatosa aumentó con la deposición de grasa. Hubo un consumo mayor de timidina endotelial, perivascular y las células parenquimatosas. Cincuenta y cuatro por ciento de los ratones de deficiencia de colina murió durante un período de 24 semanas”. (25)

Signos de toxicidad; la colina es un nutriente muy tóxico con un estrecho margen de seguridad. Williams (1960) observan que una concentración dietética de dieta 5 g de cloruro colina/kg de dieta (35.800  $\mu\text{mol/kg}$ ) inducido por la pérdida de peso en ratones BALB/c después de que fueron alimentados con esa dieta durante 6 meses, y no hubo supervivientes después de 9 meses. Después de 15 semanas 52 por ciento de los ratones tuvo lesiones del miocardio y en 33 semanas 100 por ciento de los ratones tenía lesiones del miocardio. Las lesiones más frecuentes fueron la fibrosis con necrosis limitada de fibras musculares y necrosis fibroide de arterias coronarias (Thomas et al., 1968).

#### **1.10.9.8. Folatos**

Weir et al. (1948) documentó la esencialidad de ácido fólico en el crecimiento de ratones. Fenton et al. (1950) obtuvo un desarrollo satisfactorio en ratones alimentados con dietas definidas que contienen 0, 5 mg ácido fólico /kg de dieta (1.1  $\mu\text{mol/kg}$ ). Heid et al (1992) encontró que la dieta de 0,4 a 0,5 mg/kg (0,9 a 1.1  $\mu\text{mol/kg}$ ) era necesaria para el resultado del embarazo con éxito en ratones Suizos-Webster. Basándose en estos

resultados, 0, 5 mg ácido fólico /kg de dieta ( $1.1 \mu\text{mol/kg}$ ) es el requisito estimado para ratones.

Signos de deficiencia de folatos, Weir et al (1948) observó los siguientes efectos después de la alimentación a los ratones una dieta de deficiencia de ácido fólico durante 50 días: una disminución en la cantidad de glóbulos blancos de 6.000 a 4.000/mm<sup>3</sup>, desaparición de células nucleadas en la acumulación de bazo y hemosiderina y megacariocitos y desaparición de los tipos de células normales de la médula ósea. Otros signos de deficiencia informaron que incluyen crecimiento de órganos de respuesta (Rothenberg et al., 1973), disminución de anticuerpos con problemas especialmente el cerebro y el hígado (Shaw et al., 1973) y la disminución de implantaciones fetales y mayor resorción (Heid et al., 1992).

#### **1.10.9.9. Niacina**

Datos adecuados no están disponibles para estimar el requisito de niacina de ratones. Ratones albinos masculinos BK han demostrado para convertir [<sup>14</sup>C] triptófano en N-metil-nicotinamida, un metabolito urinario de niacina (Bender et al., 1990). El ratón podrá imponer un aumento de niacina triptófano es alimentado en concentraciones debajo del nivel óptimo. Según los requerimientos de la rata, una concentración dietética de 15 mg ácido nicotínico /kg de dieta ( $120 \mu\text{mol/kg}$ ) es el requisito estimado para ratones en las condiciones más adversas (Hundley, 1949).

#### **1.10.9.10. Ácido Pantoténico**

Sandza y Cerecedo (1941) encontraron que mantenga un ritmo de crecimiento óptimo en ratones albinos inyecciones subcutáneas de 63 nmol Ca-d-pantotenato 6 días a la semana. Morris y Lippincott (1941) anunció que una dieta que contiene  $21 \mu\text{mol Ca-}$



pantotenato/kg generó crecimiento equivalente a una dieta que contiene 168  $\mu\text{mol/kg}$  en los ratones de C3H. Fenton et al. (1950) obtuvo el máximo crecimiento en ratones C57 con dietas que contiene 13 de  $\mu\text{mol/kg}$  de dieta, pero más de 17  $\mu\text{mol/kg}$  dieta fue necesaria para un crecimiento óptimo en la cepas de ratones C3H. Basándose en estos datos limitados, 10 mg Ca-d-pantotenato/kg de dieta (21  $\mu\text{mol/kg}$ ) parece ser adecuado para un crecimiento óptimo en la mayoría de las cepas de ratones, pero algunas cepas pueden tener requerimientos más altos. No existen datos sobre el requisito de embarazo y la lactancia, pero la dieta de AIN-76 se formuló para contener 16 mg de Ca-d-pantotenato/kg de dieta (33,6  $\mu\text{mol/kg}$ ). Esta dieta ha demostrado ser adecuada para soportar el embarazo y la lactancia en ratones.

Signos de deficiencia de ácido pantoténico, los signos de la deficiencia de ácido pantoténico siguiente en ratones de crecimiento fueron reportados por Morris y Lippincott (1941): pérdida de peso; pérdida de cabello particularmente de la superficie ventral, flancos y patas; Dermatitis; parálisis parcial de miembros posterior; otras anomalías neurológicas.

#### **1.10.9.11. Vitamina B6 (Piridoxina, Piridoxal, Piridoxamina)**

“De acuerdo con Miller y Baumann (1945) y Morris (1947), los ratones crecieron satisfactoriamente cuando se alimentaban con dietas que contienen la dieta de 1 mg piridoxina-HCl/kg de dieta. Piridoxamina y piridoxal resultaron para ser menos activo que la piridoxina. Bell et al. (1971) se han encontrado 0,2 mg piridoxina-HCl/kg de la dieta limita el crecimiento en dos cepas, Considerando que 8.2 mg/kg, apoyaba un crecimiento normal. Una comparación de desempeño reproductivo de cepas C57BL encontró que las concentraciones de 1 a 6 mg/kg de dieta dieron como resultado menos apareamientos productivos, menores a los cachorros, y colar una menor tasa de supervivencia en el I. Las crecientes concentraciones de piridoxina dietética a 8 a 12 mg/kg mejoraron el desempeño reproductivo, pero además la mejora no se obtuvo con las concentraciones de 410 o 1.230 mg/kg de la dieta; Sin embargo, estas

concentraciones mejoró la tasa de supervivencia de los ratones de cepa C57BL sobre una concentración de 1 a 6 mg/kg (Hoover et al., 1988). Las concentraciones de piridoxal-5'-fosfato y piridoxamina-5'-fosfato se determinaron en ratones hembra alimentados con dietas purificadas que contienen 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 7.0 de mg/piridoxina-HCl/kg de dieta durante 5 semanas. Concentraciones de plasma, eritrocitos, sangre, hígado y cerebro piridoxal-5'-fosfato y el hígado y el cerebro piridoxamina-5'-fosfato correlacionan con las concentraciones de la dietarios ( $r = 0, 81$  a  $0, 94$ ) y no meseta sobre los rangos todos dietarios de valores (Furth-Walker et al., 1990). Durante el embarazo ratones alimentados con dietas de fórmulas abiertas que contienen 8.13 mg piridoxina-HCl/kg habían aumentado sus valores de eritrocitos en sangre entera y la disminución de plasma (50 por ciento) piridoxal-5'-fosfato. Las concentraciones en el hígado de piridoxal-5'-fosfato y piridoxamina-5'-fosfato disminuyó 25 por ciento, pero la concentración en el cerebro se mantuvo sin cambios” (17). La concentración recomendada de vitamina B6 para la reproducción se establece en la dieta de 8 mg/kg. La concentración de 1 mg/kg establecidos por Miller y Baumann (1945) y por Morris (1947) parece ser adecuada para el crecimiento y mantenimiento. (12)

Signos de deficiencia de vitamina B6; la deficiencia de vitamina B6 incluyen crecimiento deficiente, híper irritabilidad, parálisis posterior, degeneración necrótica de la cola y alopecia (Beck et al., 1950). Los investigadores (Keyhani et al., 1974) observan en ratones CF1 deficientes en B6 una progresiva anemia hipocrómica microcítica con hipersideremia, la cual fue acompañada por un aumento en el conteo de reticulocitos no observado en las deficiencias de vitamina B6 de otras especies.

#### **1.10.9.12. Riboflavina**

“Según datos reportados por Fenton y Cowgill 1947a (b) y Wynder y Kline (1965), los ratones requieren 4 mg riboflavina /kg de dieta de para un crecimiento normal. Sin embargo, las dietas resultantes en la reproducción normal en colonias de ratón generalmente contienen 6 o 7 mg riboflavina /kg de dieta (Instituto estadounidense de

nutrición, 1977). En ausencia de datos más definitivos con respecto a los requisitos para la reproducción, los requisitos de riboflavina estimado para esta especie son de 7 mg/kg de dieta”. (33)

“Signos de Ariboflavinosis de la deficiencia de riboflavina en el ratón fue descrito por Lippincott y Morris (1942). Informó que el desarrollo de la epidermis Eczema o atrófica con las glándulas sebáceas normales, la degeneración de la mielina en la médula espinal y vascularización corneal con ulceración. Morris y Robertson (1943) encontraron que ratones adultos perdido peso y jóvenes ratones crecieron mal y murieron dentro de 9 semanas cuando las dietas alimentadas con riboflavina de 0,4 a 0,6 mg/kg de dieta. Kliger et al. (1944) mostró que la deficiencia de riboflavina ratones bajó resistencia a la infección de Salmonella. Hoppel y Tandler (1975) informaron sorprendente aumento en el tamaño de las mitocondrias hepáticas y una capacidad mucho menor para la respiración de ADP estimulada en ratones de deficiencia de riboflavina” (40). En algunos animales, hígados fueron amarillos y el citoplasma de las células se inundaba con lípidos pequeñas gotitas. En otros animales, los hígados eran más rojo que lo normal, y sus hepatocitos figuran algunas gotas de lípidos. Ratones genéticamente diabéticas de (KK) tenían un requisito de riboflavina superior de ratones albinos suizo basado en actividad coeficientes de eritrocitos glutatión reductasa (Reddi, 1978). La deficiencia de riboflavina durante la gestación llevó a malformaciones gastrointestinales en la descendencia. El grado de gravedad y patrón de malformación variado con la cepa de ratones estudió (Kalter, 1990).

#### **1.10.9.13. Tiamina**

“Hauschildt (1942) estableció el requisito mínimo de tiamina para el crecimiento normal de los ratones en 10 µg/día. Esto correspondería a una concentración de aproximadamente 3 mg/kg de dieta. Morris y Dubnik (1947) encontró más tarde requisito crecimiento de 4 a 6 µg/día para ratones que se alimentaban con una dieta que contiene 22 por ciento de grasa”. (39)

No se reportan los resultados de los estudios sobre los requisitos específicos para la reproducción y la lactancia, pero Mirone y Cerecedo (1947) encontró que 20 mg/kg dieta eran adecuadas. La dieta purificada de tiamina-HCl/kg dieta (Instituto estadounidense de la nutrición, 1977) que contiene 6 mg ha sido utilizada en numerosas colonias de ratón, lo que resulta en la reproducción y crecimiento normal. En ausencia de datos más definitivos es retenida la concentración de 5 mg tiamina-HCl/kg de dieta fue el requisito estimado en el número anterior de este informe (Consejo de investigación nacional, 1978).

Signos de deficiencia de tiamina Morris (1947) y Jones et al. (1945) informaron de convulsiones violentas, especialmente cuando el animal se celebró unos segundos por la cola; atado o movimientos circulares; hemorragias cerebrales; ingesta de alimentos disminución; crecimiento deficiente; mortalidad precoz; lesiones de vetas de plateado muscular; y la degeneración testicular. La aparición de ataxia en ratones de deficiencia de tiamina suizo-Webster fue precedida por un rápido aumento del cerebro  $\alpha$ -cetoglutarato (Seltzer y McDougal, 1974). Deficiencia (4 a 21 días) llevó al aumento de la actividad en pirofosfatasa de tiamina hepática, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida (Tumanov y Trebukhina, 1983). Exposición de ratones de deficiencia de tiamina a etanol resultó en daño cerebral que fue más grave que cualquier tratamiento solo (Phillips, 1987).

#### **1.10.10. OTROS COMPONENTES BENEFICIOSOS**

##### **1.10.10.1. Fibra**

Una fuente de fibra rutinariamente se incluye aumentando a granel en dietas para ratones, pero en altas concentraciones deprime el rendimiento. Dilución de las dietas con celulosa en concentraciones de 15, 30 y 50 por ciento aumentó ingesta de alimento por 3,5 12.0 y 26,9%, respectivamente, lo que resulta en el consumo de los componentes de la mono

celulosa de 88,4, 78,4 y 63,5 por ciento de lo que ratones alimentados con la dieta sin diluir consumida (Dalton, 1963). Dietas de ratón de Bell (1960) diluido con salvado de trigo, alfalfa, pulpa de remolacha, cascotes de avena, paja de trigo, mazorcas de maíz o celulosa en cantidades diseñado para diluir la energía digerible (DE) a concentraciones que van desde 2.2 a 3,4 kcal/g de dieta (9,2 a 14,2 kJ/g de dieta). En general, la tasa de crecimiento disminuyó cuando DE fue menos de 2,9 kcal/g de dieta (12,1 kJ/g de dieta). Fuentes de fibra produjeron efectos diferentes. Ratones alimentados con paja de trigo de 33 a 39 por ciento murieron. Mal crecimiento en ratones cuando su dieta consistía de pulpa de remolacha de 38 a 45 por ciento. Sin embargo, en ratones alimentados con salvado de trigo de 68 por ciento, o hasta un 43 por ciento de avena creció a tasas similares a aquellos alimentados una concentración de fibra.

Cuando la maicena fue reemplazado por salvado de cebada, salvado de avena, salvado de arroz, o fibra de soja en cantidades suministro de fibra (TDF) de 7 por ciento a las dietas que contienen carne molida de 30 por ciento, crecimiento de los ratones no fue afectado (42). Adición de goma de 10 por ciento, bagazo o salvado de trigo a una dieta de ingredientes naturales no afectó ingesta de alimento o crecimiento de ratones, aunque aumentaron la goma y bagazo disminuyeron las enzimas hepáticas lipogenia (Stanley y Newsholme, 1985).

#### **1.10.10.2. Ácido Ascórbico**

“El mantenimiento exitoso de las dietas de colonias de ratones alimentadas carentes de ácido ascórbico ha confirmado la demostración por Ball y Barnes (1941) que el ratón no requiere ninguna dieta fuente de vitamina C. La concentración plasmática de deshidroascorbato en ratones alimentados graduadas concentraciones de ácido ascórbico (de 0 a 80 g/kg de dieta) aumentadas con mayores concentraciones de dietarios;  $\geq 10$  g/kg resultó en significativamente mayor concentración de deshidroascorbato en el corazón, riñón, pulmón y del bazo. Las concentraciones en los ojos, se incrementaron, sólo

ligeramente; y el cerebro, las glándulas suprarrenales y las concentraciones de leucocitos fueron sin cambios en ratones que consumen dietas que contienen 80 g/kg”. (53)

“Durante los primeros 8 días de embarazo se encontró una relación inversa entre la ingesta de ácido ascórbico y la concentración de peroxidasa en el cuerpo lúteo, blastocisto y endometrio (Agrawal y Laloraya, 1979)”(28). “Una dieta de ácido ascórbico de 10 g/kg aumentó 8,6% en promedio de vida, disminución del peso corporal por 6 a 7 por ciento y la vida máxima en 2,9% (de 965 a 993 días) en ratones machos de C57BL/6J (Friedman et al., 1987)”. (41)

#### **1.10.10.3. Mio-inositol**

“Aunque Woolley (1941) informó que Mio-inositol podría aliviar una afección caracterizada por la pérdida de cabello, otros estudios (Martin, 1941; Cerecedo y Vinson, 1944; Fenton et al., 1950; Pastor y Taylor, s.) no confirmó la esencialidad de mio-inositol para el crecimiento de los ratones. Estudios con otras especies de roedores indican que requieren mio-inositol en condiciones de represión microbiana y estrés fisiológico. Pastor y Taylor (1974b) encontraron que mio-inositol mejorado transporta lípidos en el intestino en ratas alimentados con una dieta de grasa de 31 por ciento. Burton y Wells (1977) observó que las ratas alimentación 0,5 por ciento phthalysulfathiazole dietéticos necesario mio-inositol, para evitar que el hígado graso durante la lactancia; 500 mg mio-inositol/kg de dieta fue suficiente” (49). Anderson y Holub (1976) encontraron que sebo o el aceite de canola altamente insaturados causó la acumulación de grasa hepática en mio-inositol-deficiencia de ratas alimentadas con succinil sulfatiazol, mientras que aceite de maíz o de aceite de soja; 0,5 de por ciento de mio-inositol fue protectora. A diferencia de las ratas (Bondy et al., 1990), los nervios periféricos de ratones alimentados con dietas que contiene galactosa (20 por ciento) no se agotaron de mio-inositol (Calcutt et al., 1990).

Un ambiente gnotobióticos, libre de gérmenes, o ratones tratados con antibióticos se alimentan de las dietas que contienen sebo o el aceite de colza muy saturado, mio-inositol puede ser necesario en las dietas. Una dieta purificada alimenta al libre de germen de ratas y ratones que contiene 1000 mg mio-inositol/kg de dieta (Wostmann y Kellogg, 1967). Dietas de constitución química definidas que apoyaron el crecimiento y reproducción limitada en ratones CFW o C3H libre de germen figuran 238 mg mio-inositol/kg dieta (Pleasant et al., 1970, 1973). Una concentración de 500 mg/kg de dieta fue adecuada para cualquier combinación de antibióticos, la lactancia y el consumo de grasas inusual en ratas parece ser el límite superior de la exigencia de mio-inositol. Sin embargo, convencionalmente criados los ratones alimentados con dietas ordinarias no se ha encontrado que requieran dieta mio-inositol desde los primeros estudios de Woolley (1941, 1942).

## **CAPÍTULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

La investigación se llevó a cabo en los siguientes Laboratorios de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH:

- Bioquímica y Alimentos
- Microbiología
- Y el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia de Tecnología Ambiental.  
CESTA-ESPOCH

- Bioterio

Y las instalaciones de AGROTECNIA S.A en la Ciudad de Riobamba.

#### **2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **2.2.1. MATERIAL VEGETAL**

- Maíz Nacional
- Harina de trigo integral
- Soya
- Harina de soya integral



- Salvado de trigo

### **2.2.2. EQUIPOS**

- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza de precisión
- Bomba de vacío
- Cabina extractora de gases
- Computadora
- Cronómetro
- Deán Stark
- Desecador
- Digestor de vidrio
- Equipo Kjeldhal
- Equipo Soxhlet
- Equipo Weende
- Espectrofotómetro
- Estufa
- Incubadora
- Mufla
- pHmetro
- Refrigeradora
- Reloj
- Selladora
- Espectrofotómetro de Absorción atómica
- Molino
- Mesclador de ingredientes

### **2.2.3. MATERIALES**

- Cedazo
- Bureta
- Cápsulas de porcelana
- Crisoles de porcelana
- Espátula
- Matraces volumétricos
- Papel filtro
- Probeta graduada
- Picetas
- Pinza de bureta
- Pipetas volumétricas
- Soporte Universal
- Varilla de vidrio
- Vaso de precipitación
- Mortero
- Pistilo

### **2.2.4. REACTIVOS**

- Ácido Ascórbico
- Ácido Bórico
- Ácido Clorhídrico
- Ácido Fosfórico
- Ácido sulfúrico
- Ácido tricloro acético
- Agua bidestilada, desionizada
- Alcohol n-amílico
- Azul de metileno

- Azul de bromocresol
- Etanol
- Éter etílico
- Hidróxido de Sodio
- Lentejas de Zinc metálico
- Metanol
- Rojo de metilo
- Solución de Fehling A y B
- Solución de Carrez I y II
- Sulfato de sodio

#### **2.2.5. MEDIOS DE CULTIVO**

- Placas petrifilm para aerobios mesófilos
- Placas petrifilm para mohos y levaduras
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa
- Caldo lactosa bilis 2% verde brillante o sembrando por estría en placas de agar eosina azul de metileno o agar de Endo.

### **2.3. MÉTODOS**

#### **FASE EXPERIMENTAL**

##### **2.3.1. REQUERIMIENTOS NUTRICIONES DEL RATÓN *Mus musculus***

- Se realiza el estudio de los macro y micronutrientes que van a hacer incluidos en cada formulación según la *National Research Committee Council* que se observa en la tabla N° 2.

### **2.3.2. FORMULACION DEL ALIMENTO BALANCEADO**

#### **Procedimiento**

- Se selecciona los ingredientes a ser utilizados en las dos formulaciones
- Se realiza el análisis de nutrientes de cada formulación a elaborarse mediante el programa Nutrion Software de formulaciones para alimentos balanceados (piensos)
- Se compara los datos obtenidos en el análisis de nutrientes en el programa de formulaciones con los rangos o valores a que se requiere de los nutrientes para cada formulación
- Se realiza los cambios o variaciones para obtener las dos formulaciones ideales a evaluarse.

### **2.3.3. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES**

#### **Procedimiento**

#### **A. Elaboración de la Harina de balanceado**

- Seleccionar y pesar los ingredientes macro
- Colocar en la tolva o torre de mezclado
- Triturar hasta obtener una granulación idónea para harina.
- Seleccionar y pesar los ingredientes micro (pre-mezcla de vitaminas, minerales y, secuestrantes de toxinas , antibióticos , antioxidantes y aminoácidos)
- Pre-mezclado de los micro y macro ingredientes

- Mezclar y homogenizar todos los ingredientes para obtener la harina del balanceado.

## **B. Preparación de la formulación en pellets artesanales**

- Limpieza del área de elaboración según BPM
- Limpieza y esterilización en seco (Estufa a 120°C x 2 h.) de los materiales para la preparación (Espátula, bandeja de soporte, olla de mezclado)
- Hervir el agua a ser utilizada en la mezcla
- Pesaje de la harina de balanceado (cantidad que varía de acuerdo a lo requerido diariamente para la alimentación de los ratones aproximadamente 1 Kg de harina).
- Mezclado de la harina con el agua hasta obtener una masa homogénea y moldeable en una proporción (5:2) aproximadamente
- Elaboración manual de los pellets
- Colocación de pellets en la bandeja de secado
- Proceso de secado a 110 °C x 40 minutos
- Enfriar los pellets
- Almacenar el producto en fundas plásticas de 1 Kg selladas a una temperatura ambiente.

### **2.3.4. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LAS DOS FORMULACIONES**

#### **2.3.4.1. DETERMINACIÓN DEL PH**

(NTE INEN 389)

#### **Principio**

Se basa en la determinación de la actividad de iones hidrógeno medidos en un potenciómetro usando un electrodo de vidrio y otro de referencia. La fuerza electromotriz producida por el sistema de electrodos es proporcional al pH de la solución problema.

### **Procedimiento**

Si la muestra corresponde a productos densos o heterogéneos, homogenizarla con ayuda de una pequeña cantidad de agua (recientemente hervida y enfriada) con agitación.

- Colocar el vaso de precipitación aproximadamente 10g de la muestra preparada, añadir 100mL de agua destilada (recientemente hervida y enfriada) y agitar suavemente.
- Dejar en reposos el recipiente para que el líquido se decante, si existen partículas en suspensión
- Determinar el pH introduciendo los electrodos del potenciómetro, en el vaso de precipitación con la muestra, cuidando que estos no toquen las paredes del recipiente ni las partículas sólidas.

### **2.3.4.2. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA (MÉTODO DE DESECACIÓN EN ESTUFA DE AIRE CALIENTE). (NTE INEN 518).**

#### **Principio**

Consiste en eliminar el contenido de humedad mediante la circulación de aire caliente en la estufa a una temperatura de  $103 \pm 3$  °C hasta peso constante, el secado tiene una duración de 2 - 3 horas.

### **Procedimiento**

- Tarar la cápsula de porcelana previamente.
- Pesar 1 a 10 g de muestra ( Previamente realizado su desmuestre) en un vidrio reloj
- Colocar en la estufa a 103°C +-3°C por un lapso de 3 horas.
- Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar.
- La determinación debe realizarse por duplicado.

### **Cálculos:**

$$SS (\%) = \{(m_2 - m) / (m_1 - m)\} \times 100$$

$$\% \text{ HUMEDAD} = 100 - \% \text{ SS}$$

### **En donde:**

**SS** = Sustancia seca en porcentaje en masa

**m** = Masa de la cápsula en g

**m<sub>1</sub>** = Masa de cápsula con la muestra en g

**m<sub>2</sub>** = masa de la cápsula con la muestra después del calentamiento en g

### **2.3.4.3.DETERMINACIÓN DE GRASA O EXTRACTO ETÉREO (MÉTODO DE SOXHLET)**

### **Principio**

Los lípidos son insolubles en el agua y menos densos que ella. Se disuelven bien en disolventes no polares, tales como el éter sulfúrico, sulfuro de carbono, benceno, cloroformo y en los derivados líquidos del petróleo.

El contenido en lípidos libres, los cuales consisten fundamentalmente de grasas neutras (triglicéridos) y de ácidos grasos libres, se puede determinar en forma conveniente en los alimentos por extracción del material seco y reducido a polvo con una fracción ligera del petróleo o con éter dietílico en un aparato de extracción continua.

### **Procedimiento**

- Pesar 2 g de muestra seca y colocar en el dedal, luego introducirlo en la cámara de sifonación
- En el balón previamente tarado, adicionar 50 mL. de éter etílico o éter de petróleo (se puede usar también hexano) o la cantidad adecuada dependiendo del tamaño del equipo.
- Embonar la cámara de sifonación al balón.
- Colocar el condensador con las mangueras sobre la cámara de sifonación.
- Encender la parrilla, controlar la entrada y salida de agua y extraer por 8 a 12h.
- Al terminar el tiempo, retirar el balón con el solvente más el extracto graso y destilar el solvente
- El balón con la grasa bruta o cruda colocar en la estufa por media hora, enfriar en desecador y pesar.

### **Cálculos**

$$\%G (\% \text{ Ex. E}) = \{(P1-P)/m\} \times 100$$

### **En donde:**

**%G** = grasa cruda o bruta en muestra seca expresado en porcentaje en masa



$P_1$  = masa del balón más la grasa cruda o bruta extraída en g

$P$  = masa del balón de extracción vacío en g

$m$  = masa de la muestra seca tomada para la determinación en g.

#### **2.3.4.4. DETERMINACIÓN DE CENIZAS**

(MÉTODO DE INCINERACIÓN EN MUFLA) (NTE INEN 520).

##### **Principio**

Se lleva a cabo por medio de incineración seca y consiste en quemar la sustancia orgánica de la muestra problema en la mufla a una temperatura de  $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ ., previa calcinación en campana de gases, con esto la sustancia orgánica se combustiona y se forma el  $\text{CO}_2$ , agua y la sustancia inorgánica (sales minerales) se queda en forma de residuos, la incineración se lleva a cabo hasta obtener una ceniza color gris o gris claro.

##### **Procedimiento**

- Colocar la cápsula con la muestra seca resultado de la determinación del contenido de humedad en la Sorbona sobre un mechero, para calcinar hasta ausencia de humos.
- Transferir la cápsula a la mufla e incinerar a  $500^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 2 – 3 horas, hasta obtener cenizas libres de residuo carbonoso.
- Sacar la cápsula y colocar en desecador, enfriar.
- Pesar la cápsula.
- Realizar la determinación debe hacerse por duplicado.

##### **Cálculos:**

$$\% C = \{(m_2 - m) / (m_1 - m)\} \times 100$$

**En donde:**

**%C** = Contenido de cenizas en porcentaje de masa.

**m** = Masa de la cápsula vacía en g

**m<sub>1</sub>** = Masa de cápsula con la muestra antes de la incineración en g

**m<sub>2</sub>** = masa de la cápsula con las cenizas después de la incineración en g

#### **2.3.4.5. DETERMINACIÓN DE FIBRA**

(MÉTODO DE WEENDE)

##### **Principio**

El método se basa en la digestión secuencial de la muestra sin grasa con una solución de ácido sulfúrico, y con una solución de hidróxido de sodio, el residuo insoluble se colecta por filtración, se lava, seca y se pesa y lleva a la mufla para descontar el porcentaje de minerales.

##### **Procedimiento**

- Pesar 2 gr de muestra seca y desengrasada, y colocar en un vaso de precipitación con 250 ml de ácido sulfúrico al 1,25%
- Colocar el vaso en la hornilla del reverbero y calentar hasta ebullición
- Mantener la ebullición por 30 minutos exactos a partir de que empieza a hervir.
- Enfriar y filtrar al vacío la solución caliente a través del papel de filtro. Lavar el residuo con 250 ml de agua destilada caliente.
- Trasvasar el residuo cuantitativamente al vaso y añadir 250 ml de NaOH al 1,25 %.

- Colocar el vaso en la hornilla del reverbero, calentar hasta ebullición y mantener la ebullición 30 minutos exactos a partir de que empieza a hervir.
- Retirar de la hornilla, enfriar y filtrar sobre crisol Gooch conteniendo una capa de lana de vidrio previamente tarado.
- Lavar el residuo con 250 ml agua destilada caliente, hasta la eliminación del hidróxido de sodio en el filtrado, y lavar finalmente con 15 ml de hexano o etanol.
- Colocar el crisol de Gooch en la estufa a 105 ° C durante toda la noche, enfriar en el desecador y pesar.
- Colocar el crisol de Gooch en la mufla a 550° C hasta que el contenido sea de color blanco durante 30 minutos, enfriar en el desecador y pesar.

**Cálculos:**

$$\%FB = \left\{ (P_1 - P) / m \right\} \times 100$$

**En donde:**

%FB= Contenido de Fibra cruda o bruta en muestra seca y desengrasada expresada en porcentaje de masa

P1= masa del crisol más el residuo desecado en la estufa en gramos

P= masa del crisol más las cenizas después de la incineración en la mufla en gramos

m= masa de la muestra seca y desengrasada tomada para la determinación en gramos

Fibra bruta en base seca:

$$\%F.B. Fresca = \frac{\%FB \times 100}{100 - \%H}$$

**En donde:**

%F.B.S = % Fibra en Base Seca.

%FB= % Fibra Bruta

%H = % Humedad

#### **2.3.4.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA** (MÉTODO DE MICRO KJELDHAL)

##### **Principio**

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en ácido bórico, formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico en presencia de indicador mixto.

##### **Procedimiento**

- Pesar exactamente 40 mg de muestra seca e introducirla en el balón de digestión Kjeldhal
- Añadir: 1,5 g de sulfato de sodio o potasio, 40 mg de óxido mercurico, 2 ml de ácido sulfúrico concentrado p.a. procurando no manchar las paredes del mismo
- Colocar el balón en el digestor y calentar hasta obtener un líquido transparente
- Enfriar el balón y su contenido, adicionar 4 ml de agua destilada para disolver el contenido que al enfriarse se solidifica
- Verter lo anterior en el balón de destilación del equipo, adicionando otros 4 ml de agua destilada para enjuagar el balón
- Cerrar la llave y colocar 8 ml de hidróxido de sodio al 40% y 2 ml de bisulfato de sodio al 5%, abrir la llave y verter dejando pasar lentamente al balón de destilación.
- Recibir el destilado en el tubo de salida del destilador conteniendo 12 ml de ácido bórico al 4% y 8 ml de agua destilada al que se le añade de 3 a 4 gotas del indicador mixto rojo de metilo y verde de bromocresol.
- Destilar hasta obtener 30 ml de destilado.
- Titular el destilado con ácido clorhídrico 0,1N estandarizado
- La determinación debe hacerse por duplicado.

**Cálculos:**

$$\%PB = 1.4 \times f \times V \times N / m$$

%P = contenido de proteína en porcentaje de masa

f = factor para transformar el % N<sub>2</sub> en proteína y que es específico para cada alimento

V = volumen de ácido clorhídrico 0,1 N empleado para titular la muestra en ml

N = normalidad del ácido clorhídrico

m = masa de la muestra en gramos

Proteína en Base Seca:

$$\%P.B.S = \frac{\%PB \times 100}{100 - \%H}$$

**En donde:**

%P.B.S = % Proteína en Base Seca.

%PB=% Proteína Bruta

%H = % Humedad

**2.3.4.7. EXTRACTO LIBRE NO NITROGENADO (ELnN)**

(MÉTODO POR CÁLCULO)

**Principio**

El extracto libre no nitrogenado (ELN), de un alimento se determina restando de 100 la sumatoria de las cinco determinaciones del proximal en muestra fresca (cenizas, fibra cruda, extracto etéreo, proteína bruta y humedad).

**Cálculos:**

$$\%ELnN = 100 - \Sigma (\%H + \%C + \%F + \%Ex. E + \%P)$$

**En donde:**

%ELnN= porcentaje de carbohidratos digeribles.

%H= porcentaje de humedad

%C porcentaje de cenizas

%F= porcentaje de fibra

%Ex. E= porcentaje de extracto etéreo

%P= porcentaje de proteína

**2.3.4.8. DETERMINACIÓN DE CALCIO Y FÓSFORO**

Técnica de Absorción atómica - CESSTA

**2.3.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

**2.3.5.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS**

(MÉTODO AOAC 990.12 RECuento DE AEROBIOS EN ALIMENTOS, FILM SECO REHIDRATABLE)  $35 \pm 1$  °C / 48 HORAS  $\pm$  3h).

**Principio**

Este procedimiento microbiológico indica el estado de conservación de un alimento y mide el número de microorganismos aerobios por cantidad de alimento. El método consiste en cuantificar la cantidad de bacterias vivas o de unidades formadoras de colonias que se encuentran en una determinada cantidad de alimento.

## **Procedimiento**

- Con una espátula estéril coger la muestra y pesar 10 g de muestra o múltiplos de 10.
- Añadir 90 cm<sup>3</sup> de diluyente a la temperatura adecuada.
- Preparada la disolución inicial, centrifugar y operar con el sobrenadante.
- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.
- Con una pipeta perpendicular a la placa petrifilm colocar 1 mL de muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior, dejar que caiga. No deslizarlo hacia abajo.
- Con la cara lisa hacia arriba, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar un minuto a que se solidifique el gel.
- Incubar las placas cara arriba a 37 °C por 48 h.
- Leer las placas en un contador de colonias estándar puede ser tipo Quebec o una fuente de luz con aumento. Para leer los resultados consultar en la guía de interpretación.

### **2.3.5.2. DETERMINACION DE HONGOS (MOHOS Y LEVADURAS)**

(MÉTODO AOAC 997.02: RECUENTO DE LEVADURAS Y MOHOS, FILM SECO REHIDRATABLE) 20-25 ± 1 °C / 5 DÍAS)

## **Principio**

Un indicador colorea las colonias para dar contraste y facilitar el recuento. Las colonias de levaduras son: pequeñas, de bordes definidos, cuyo color varía de rosado oscuro a verde azul, tridimensional, usualmente aparecen en el centro.

Las colonias de mohos son: grandes bordes difusos de colores variables (el moho puede producir su pigmento propio), planos, usualmente presentan un núcleo central.

### **Procedimiento**

- Con una espátula estéril coger la muestra y pesar 10 g de muestra o múltiplos de 10.
- Añadir 90 cm<sup>3</sup> de diluyente a la temperatura adecuada.
- Preparada la disolución inicial, centrifugar y operar con el sobrenadante.
- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.
- Con una pipeta perpendicular a la placa petrifilm colocar 1 mL de muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior, dejar que caiga. No deslizarlo hacia abajo.
- Con la cara lisa hacia arriba, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar un mínimo a que solidifique el gel.
- Incubar las placas cara arriba a 37 °C por 72 h.

### **2.3.5.3. DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES Y *E. Coli***

(MÉTODO INEN 1529-6. TÉCNICA N.M.P)

### **Procedimiento**

- Preparar las muestras del alimento
- Pipetear 1 mL de cada una de las diluciones del homogeneizado escogidas en tubos de caldo lauril sulfato triptosa utilizando 3 tubos por cada dilución.
- Incubar los tubos a  $44.5 \pm 1$  °C. durante 24 y 48h.



- Pasada las 24 horas, anotar los tubos con producción de gas. Volver a la estufa los tubos negativos para su incubación durante 24 horas más.
- Pasadas las 48 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas.
- Confirmar que los tubos de caldo lauril sulfato triptosa seleccionados en 8.2.5 son positivos de coliformes, transfiriendo un asa de cada tubo a otro tubo de caldo lactosa bilis 2% verde brillante o sembrando por estría en placas de agar eosina azul de metileno o agar de Endo.
- Incubar los tubos de confirmación de 24 a 48 h a  $44.5 \pm 1$  °C.
- En eosina azul de metileno se confirma la presencia de coliformes por la formación de colonias negras, o con el centro negro, o colonias mucoides de color rosa-naranja.
- Anotar el número de tubos confirmados como positivos de organismos coliformes en cada dilución.
- Para obtener el NMP, ver en cada una de las tres diluciones seleccionadas el número de tubos en los que se confirmó la presencia de coliformes. Buscar en la tabla del NMP y anotar el NMP que corresponda al número de tubos positivos en cada dilución.

#### **2.3.5.4. DETERMINACION DE COLIFORMES TOTALES**

(MÉTODO INEN1529-6. TÉCNICA N.M.P)

##### **Procedimiento**

- Preparar las muestras del alimento
- Pipetear 1 mL de cada una de las diluciones del homogeneizado escogidas en tubos de caldo lauril sulfato triptosa utilizando 3 tubos por cada dilución.
- Incubar los tubos a 35-37°C durante 24 y 48h.
- Pasada las 24 horas, anotar los tubos con producción de gas. Volver a la estufa los tubos negativos para su incubación durante 24 horas más.

- Pasadas las 48 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas.
- Confirmar que los tubos de caldo lauril sulfato triptosa seleccionados en 8.2.5 son positivos de coliformes, transfiriendo un asa de cada tubo a otro tubo de caldo lactosa bilis 2% verde brillante o sembrando por estría en placas de agar eosina azul de metileno o agar de Endo.
- Incubar los tubos de confirmación de 24 a 48 h a 35 37°C.
- En eosina azul de metileno se confirma la presencia de coliformes por la formación de colonias negras, o con el centro negro, o colonias mucoides de color rosa-naranja.
- Anotar el número de tubos confirmados como positivos de organismos coliformes en cada dilución.
- Para obtener el NMP, ver en cada una de las tres diluciones seleccionadas el número de tubos en los que se confirmó la presencia de Coliformes. Buscar en la tabla del NMP y anotar el NMP que corresponda al número de tubos positivos en cada dilución.

#### **2.3.6. EVALUACION DE LA EFICACIA DE LAS FORMULACIONES**

- Definir condiciones de evaluación
  - a) Horas de alimentación: Solo en la noche 7:00 PM-8:00 PM
  - b) Condiciones ambientales: Temperatura 23 °C
  - c) Edad: Individuos post-destete
  - d) Horario de pesaje: Antes y después de la alimentación x 3 repeticiones
  - e) Condiciones de luz: Ausencia parcial de luz durante la crianza
  - f) Condiciones de alimentación : *ad libitum*
- Seleccionar los grupos a evaluarse
  - a) Grupo Blanco o control (F)
  - b) Grupo de Formulación (F1)
  - c) Grupo Formulación (F2)
- Establecer la población de cada grupo a evaluarse (número de individuos :4 individuos por grupo)
- Recolectar los datos de la evaluación y tabular.

### **2.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó aplicando el test de ANOVA unifactorial con un nivel de significancia del 95%.

Para la determinación de los grupos estadísticos concluyentes se utilizó el test de Tukey HSD con un nivel de significación del 95% mediante la aplicación del programa G-STAT versión 2.0 de autoría de Emilio Leton Molina y Alejandro P. Marino miembros del Departamento de Biometría, GlaxoSmithKline S.A., Tres Cantos, Madrid.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. FORMULACION DEL ALIMENTO BALANCEADO

CUADRO N° 1 FORMULACIÓN F1 Y ANÁLISIS DE NUTRIENTES

INGREDIENTE	PESO (Kg)
Maíz nacional	30.2466
Harina de trigo integral	20.000
Concentrado de soya 47.8%	14.8274
Soya Integral	14.0979
Pulido de arroz	10.000
Salvado de trigo	9.000
Calcio 38%	0.8734
Metionina 99%	0.2162
Secuestrante de toxinas (Toxiban)	0.200
Pre-mezcla de Vitaminas (VIT-INI-AVES)	0.150
Antifúngico(Mycocap )	0.100
Vitamina C (ácido ascórbico)	0.100
Cloruro de sodio	0.0912
Flavomicina (Antibiótico)	0.050
Cloruro de Colina	0.030
Antioxidantes (Redox T)	0.013
Fosfato Mono –Di 21/17	0.0023
Total	100.00
Costo de Tonelada	491.46
Análisis de Nutrientes	

Nutriente	Porcentaje (%)	Nutriente	Porcentaje (%)
Fibra	4.153	Proteína	20
Ceniza	5.143	Grasa	7.251
Fósforo asimilable	0.159	Calcio	0.4
Potasio	0.922	Fósforo Total	0.4
Sodio	0.12	Cloruros	0.115
Arginina	1.327	Metionina	0.52
Met + Cis	0.86	Lisina total	0.988
Isoleucina	0.859	Histidina	0.484
Valina	0.987	Leucina	1.640
Fenilalanina	1.005	Treonina	0.746
Ácido Linoléico	2.497	Triptófano	0.237

## CUADRO 2: FORMULACIÓN F2 Y ANÁLISIS DE NUTRIENTES

INGREDIENTE	PESO (Kg)
Maíz nacional	36.7311
Harina de trigo integral	20.000
Concentrado de soya 47.8%	12.596
Pulido de arroz	10.000
Soya Integral	9.7249
Salvado de trigo	9.000
Calcio 38%	0.8693
Metionina 99%	0.243
Secuestrante de toxinas (Toxiban)	0.200
Pre-mezcla de Vitaminas (VIT-INI-AVES)	0.150
Fosfato (Mono-Di 21/15)	0.1003
Antifúngico(Mycocap )	0.100
Vitamina C (ácido ascórbico)	0.100
Cloruro de sodio	0.0925
Flavomicina (Antibiótico)	0.050
Cloruro de Colina	0.030
Antioxidantes (Redox T)	0.013
Total	100.00

---

**Costo de Tonelada 476.69**

Análisis de Nutrientes			
Nutriente	Porcentaje (%)	Nutriente	Porcentaje (%)
Fibra	4.004	Proteína	18
Ceniza	4.925	Grasa	6.701
Fósforo asimilable	0.174	Calcio	0.4
Potasio	0.83	Fósforo Total	0.4
Sodio	0.12	Cloruros	0.115
Arginina	1.156	Metionina	0.52
Met + Cis	0.834	Lisina total	0.837
Isoleucina	0.713	Histidina	0.423
Valina	0.87	Leucina	1.501
Fenilalanina	0.885	Treonina	0.652
Ácido Linoléico	2.20	Triptófano	0.205

De acuerdo a las recomendaciones de los subcomités de nutrición del *National Research Council Committee* se formularon 2 preparaciones alimenticias de ingredientes naturales para evaluar la eficacia del alimento en el incremento de peso de los ratones *Mus musculus* del bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH; dichas formulaciones se detallan en los cuadros N° 1 y N° 2.

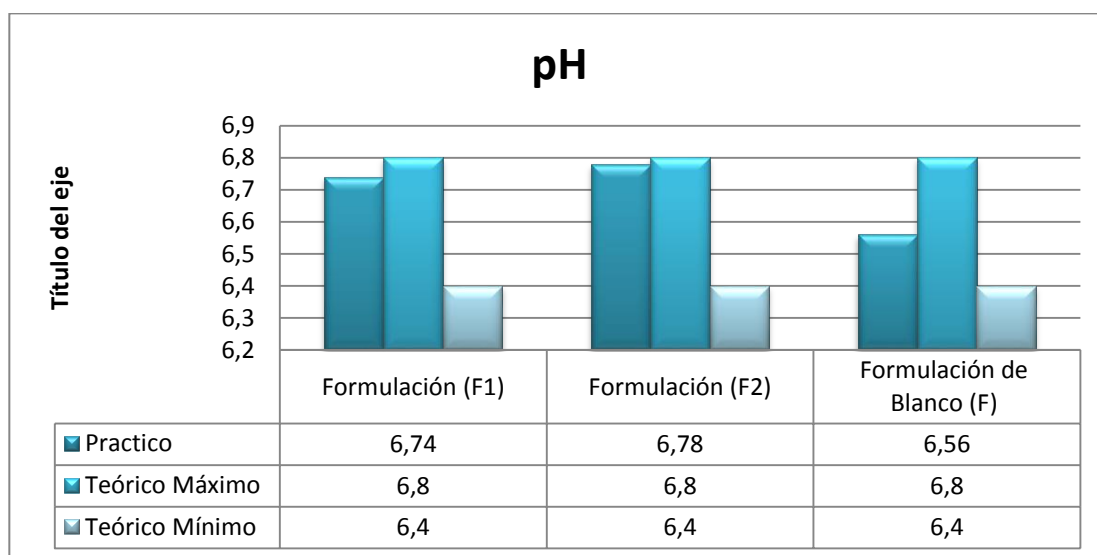
Las 2 formulaciones tienen parámetros que se requieren en la etapa de crecimiento y la fase de manutención de la especie *Mus musculus* de manera importante el porcentaje de proteína que es requerido durante estas etapas según Bell y Keith, quien denota la importancia de la proteína en la renovación de tejidos en las distintas etapas de vida del ratón; formulaciones que se han realizado en base a ingredientes naturales como se observan en los cuadros N° 1 y N° 2.

### 3.2. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES

En el proceso de elaboración del alimento balanceado para la alimentación del ratón , se establecieron dos fases de elaboración siendo la primera la elaboración de la harina con buenas características organolépticas como de olor agradable, un color amarillo claro y de buena granulación importante en el proceso de aglutinación para elaborar el producto final; en la fase elaboración del pellets se obtuvo el producto final con características parecidas a los pellets comerciales distribuidos por Molinos Championsh en cuanto a su color , olor y tamaño.

### 3.3. ANALISIS BROMATOLÓGICO

#### 3.3.1. DETERMINACIÓN DEL PH

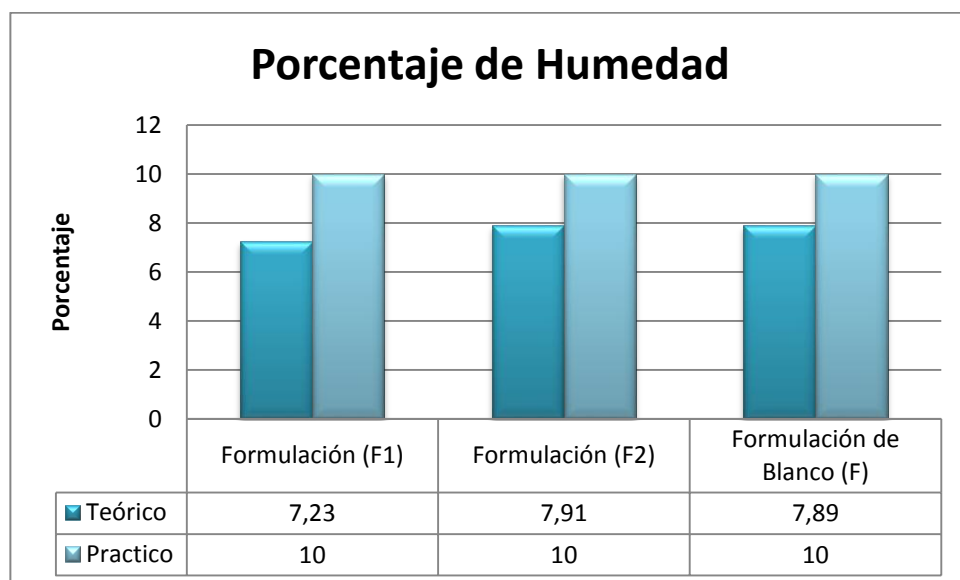


**Gráfico N° 1 Relación de pH en las formulaciones**

Como podemos observar en el gráfico N° 1 el valor de pH de las formulaciones analizadas de (F1), (F2) y la formulación (F), se encuentran dentro de los parámetros

expresados por la *National Research Council Committee* para la formulación de dietas comerciales para animales de experimentación que expresa que los parámetros de pH deben estar entre 6.8-6.4 siendo alimentos ligeramente ácidos concordando con su composición de proteínas y ácidos grasos presentes en las formulaciones que evidentemente lo harían de naturaleza acida.

### 3.3.2. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA

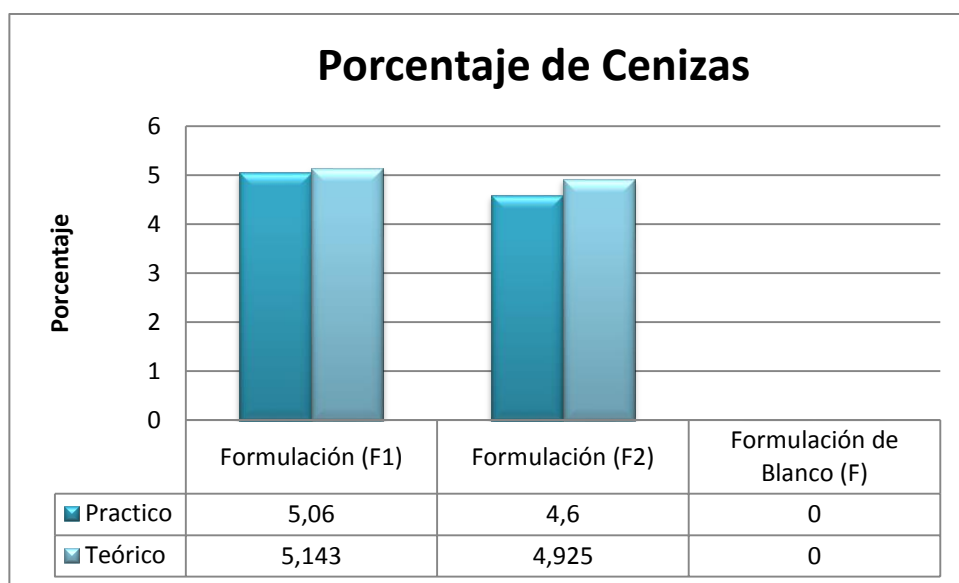


**Gráfico N° 2 Relación de contenido de humedad en las formulaciones**

En cuanto al valor de la humedad que aprecia en el gráfico N° 2 la formulación (F2) tiene una humedad mayor en relación (F1) y (F) pero ninguna de las tres formulaciones evaluadas superan al límite máximo de 10% de humedad que determina la *National Research Council Committee* para la formulación de dietas comerciales para animales de experimentación, porcentajes que garantizarían una estabilidad química y microbiológica por la baja actividad de agua para el crecimiento bacteriano.



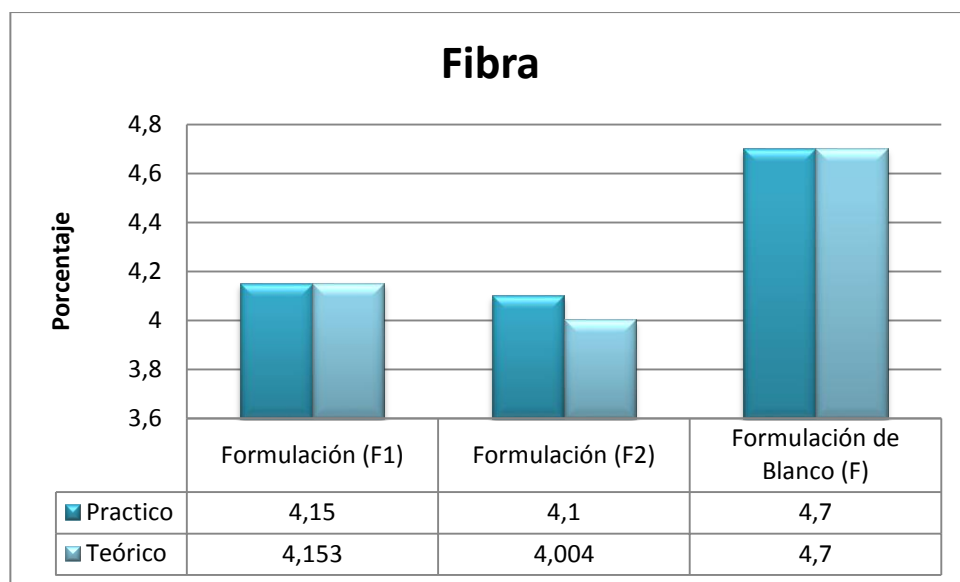
### 3.3.3.DETERMINACIÓN DE CENIZAS



**Gráfico N°3 Relación de contenido de cenizas en las formulaciones**

Como se observa en el gráfico N° 3 el % de cenizas de la formulación (F1) mucho mayor a la formulación (F2), pero estos valores no son los esperados de acuerdo al análisis de nutrientes que se realiza al momento de la formulación en el programa de formulación de balanceados Nutrion Software, el resultado de ceniza se ve influenciado por aspectos tecnológicos de la preparación del alimento balanceado y del momento del muestreo para el análisis según *Knapka et al*; cabe recalcar que estos datos están obtenidos en base seca.

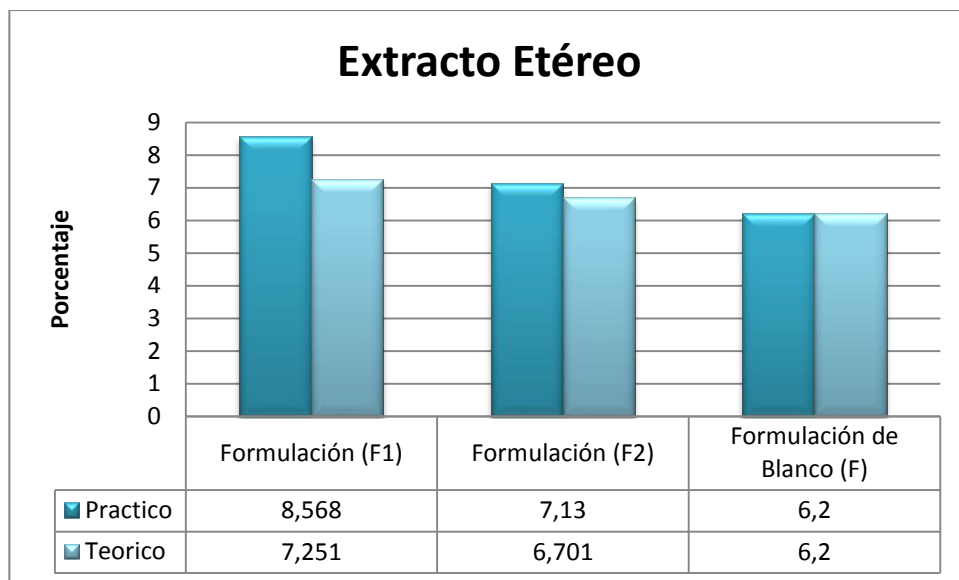
### 3.3.4. DETERMINACIÓN DE FIBRA



**Gráfico N° 4 Relación de contenido de fibra en las formulaciones**

Como se observa en el gráfico N° 4 se determinó que la presencia de fibra es mayor en (F) con respecto a (F1) y (F2) pero el contenido de fibra de las tres formulaciones no superan lo establecido por la *National Research Council Committee* que tiene como límite el 10 % , pero este requerimiento de fibra es muy cuestionable ya que el superar este valor de 10% acarrearía que se deprima la eficiencia en el rendimiento de consumo de los otros nutrientes en la dieta para los ratones de experimentación no se han determinado los efectos en bibliografía de la baja ingesta de fibra aunque las recomendaciones de la *National Research Council Committee* predice un mínimo del 3% ya que ayudaría a la digestibilidad de los animales de experimentación.

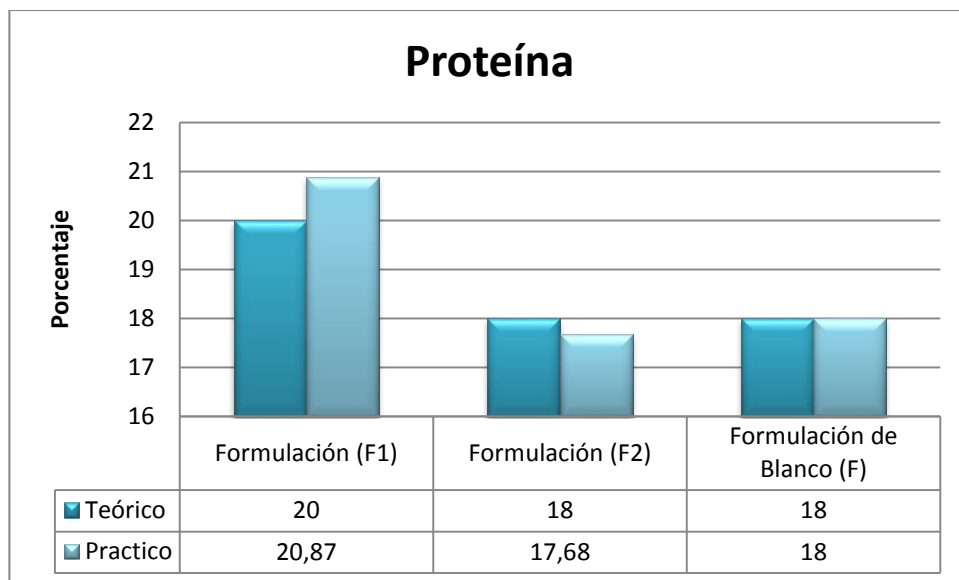
### 3.3.5. DETERMINACIÓN DE GRASA O EXTRACTO ETÉREO



**Gráfico N° 5 Relación de contenido de extracto etéreo en las formulaciones**

Como se observa en el gráfico N° 5 la porción de grasa presente difiere entre las 3 formulaciones en comparación al dato teórico propia de cada formulación y entre sí, siendo la formulación (F1) la que posee mayor porcentaje de grasa con relación a la (F2) y (F). Estos valores en el rango o porcentaje requerido para la nutrición animal de ratones de laboratorio según la *National Research Council Committee* pero a la vez este organismo de regulación indica que este valor de grasa de 5% no apoya la longevidad ni el crecimiento acelerado de los animales, ni tampoco el aumento en las camadas por lo cual se sugirió aumentar el porcentaje de grasa ya que hay la evidencia de dietas administradas hasta con un 40 % de grasa sin mayores efectos adversos, aunque desde el punto de vista químico no apoyaría a la conservación del alimento debido a una posible auto oxidación que no sería tan probable ya que la formulaciones (F1) y (F2) poseen antioxidantes en su constitución.

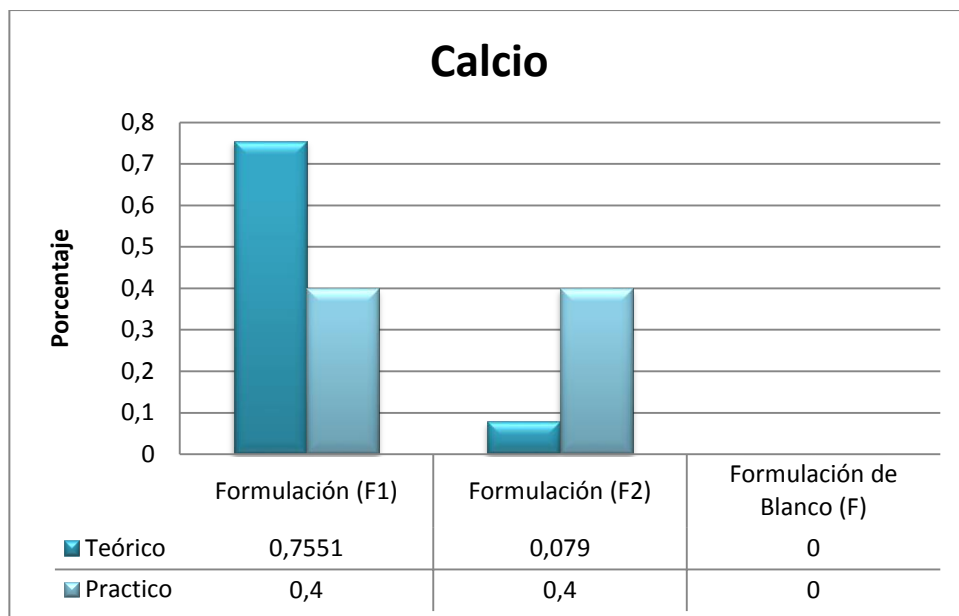
### 3.3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA



**Gráfico N° 6 Relación de contenido de proteína en las formulaciones**

Como se puede observar en el gráfico N° 6 la formulación (F1) tiene 20.87% de proteína, mientras la formulación (F2) posee un 17.68% de proteína y la formulación (F) teóricamente posee 18% de proteína observándose que la (F1) posee una mayor porcentaje proteico tal como se observa en los respecto a las otras formulaciones, cabe recalcar que mediante el análisis de nutrientes del cuadro 1 y cuadro 2 se denota la presencia de la constitución aminoacídica de la proteína cruda de las formulaciones las cuales cumplen con los parámetros establecidos por la *National Research Council Committee*.

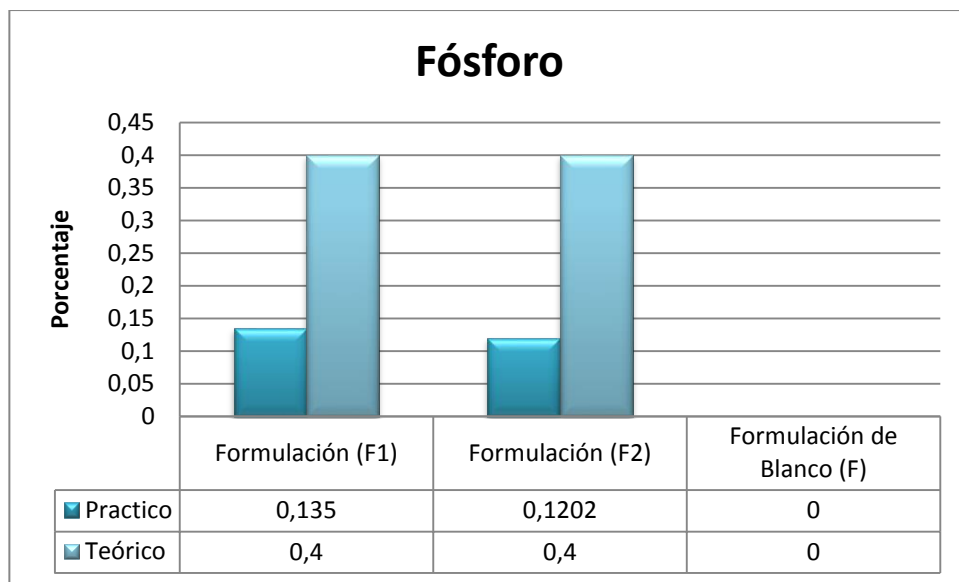
### 3.3.7. DETERMINACIÓN DE CALCIO



**Gráfico N° 7 Relación de contenido de calcio en las formulaciones**

Como se puede observar en el gráfico N° 7 la determinación de Calcio tiene 755.1mg/100g en la formulación (F1), superior al valor teórico que es 400 mg/100g evidenciándose una variación  $\pm 47.03$  %; en cuanto a la formulación (F2) el valor obtenido de calcio fue 79mg/100g en contraste al valor teórico de 400mg/100mg observándose una variación  $\pm 80.25$ %; de estas variaciones según *R.S. Kirk, R. Sawyer. H. Egan* menciona que se podrían dar debido a las interferencias espectrales de otros metales y las interferencias químicas de los fosfatos que pueden conducir a resultados erróneos cuando se utiliza métodos espectrofotométricos de absorción atómica para determinación de micronutrientes en alimentos.

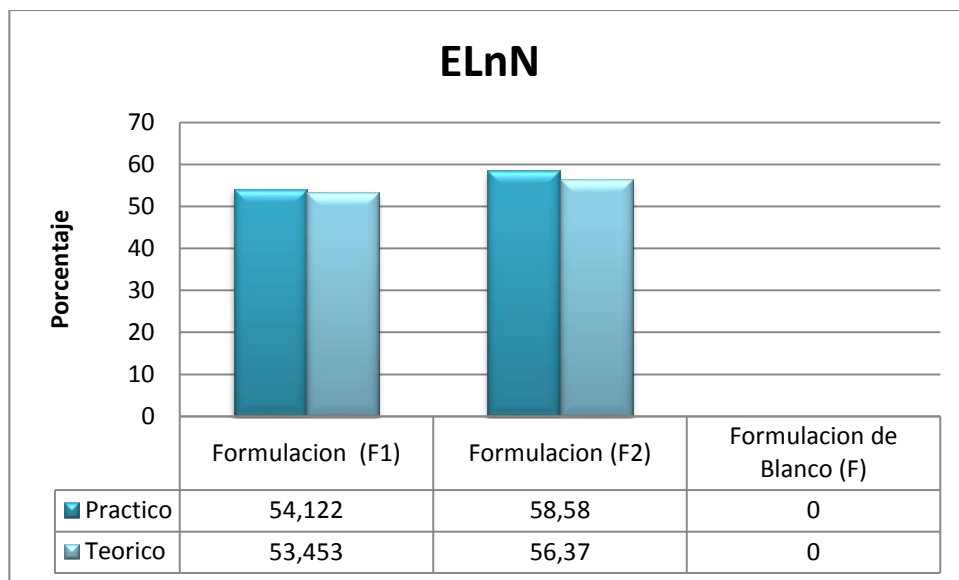
### 3.3.8. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO



**Gráfico N° 8 Relación de contenido de fósforo en las formulaciones**

Como se puede observar en el gráfico N° 8 la determinación de fósforo tiene 135.0mg/100g en la formulación (F1), inferior al valor teórico que es 400 mg/100g evidenciándose una variación  $\pm 66.25\%$ ; en cuanto a la formulación (F2) el valor obtenido de calcio fue 120.2mg/100g en contraste al valor teórico de 400mg/100mg observándose una variación  $\pm 69.95\%$ ; de estas variaciones pueden deberse a las interferencias espectrales de otros metales o compuestos y las interferencias químicas de los compuestos unidos al calcio que conducirían a resultados erróneos cuando se utiliza métodos espectrofotométricos de absorción atómica para determinación de micronutrientes en alimentos.

### 3.3.9. EXTRACTO LIBRE NO NITROGENADO (ELnN)

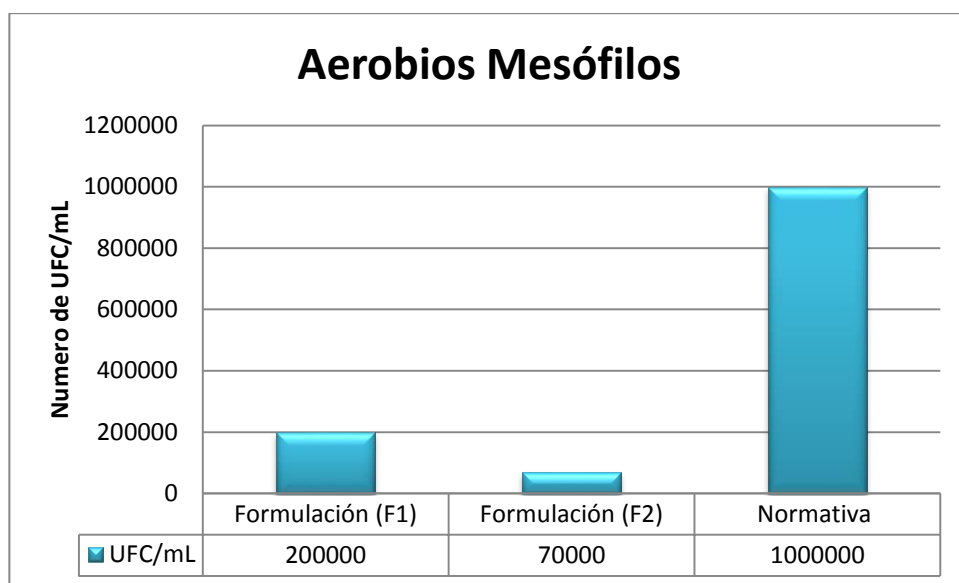


**Gráfico N° 9 Relación de contenido de ELnN en las formulaciones**

Como se puede observar en el gráfico N° 9 se determina que en la formulación (F2) el valor del ELnN es mayor a la formulación (F1) habiendo mayor presencia de carbohidratos digeribles en la (F2).

### 3.4. ANALISIS MICROBIOLÓGICO

#### 3.4.1. DETERMINACIÓN DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS

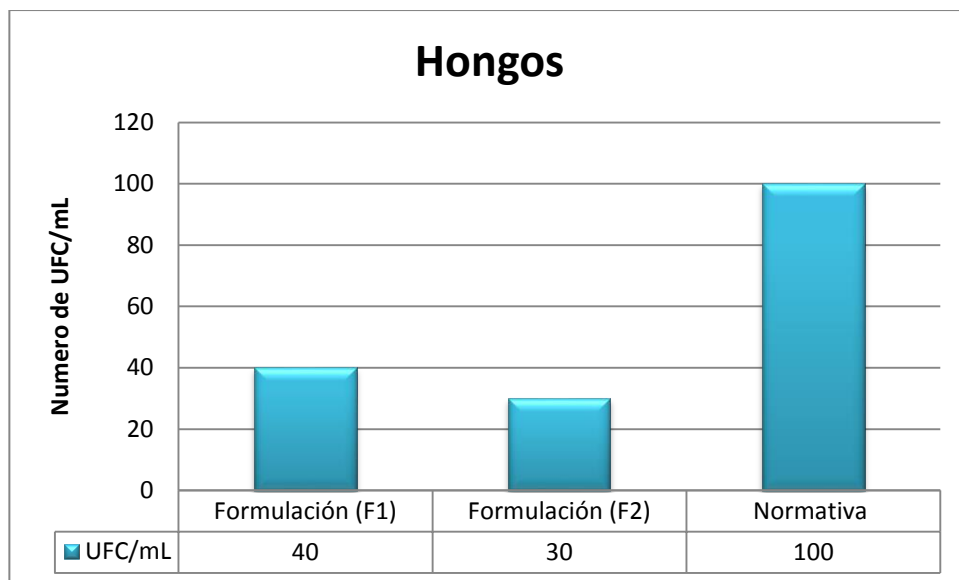


**Gráfico N° 10 Relación de Aerobios Mesófilos en las Formulaciones**

Tal como se observa en el grafico N° 10 la formulación (F1) y (F2) cumplen con los parámetros microbiológicos con la presencia de Aerobios mesófilos en los alimentos balanceados para ratones de laboratorio establecidos la *National Research Council Committee*, acotando que la presencia de estos microorganismos no causan patogenicidad alguna para los ratones *Mus musculus* según *Hatch y Laflamme*.



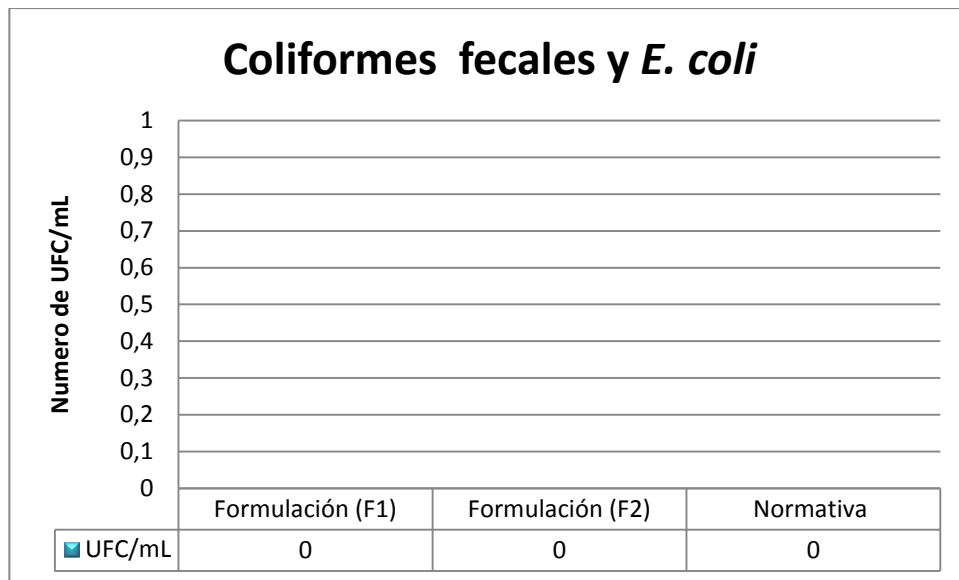
### 3.4.2. DETERMINACIÓN DE HONGOS (MOHOS Y LEVADURAS)



**Grafico N° 11 Relación de Hongos (mohos y levaduras) en las Formulaciones**

Tal como se observa en el grafico N° 11 la formulación (F1) y (F2) cumplen con los parámetros microbiológicos con la presencia de mohos y levaduras en los alimentos balanceados para ratones de laboratorio establecidos la *National Research Council Committee*, presencia de estos microorganismos que son controlados en la formulación con la adición de un antifúngico.

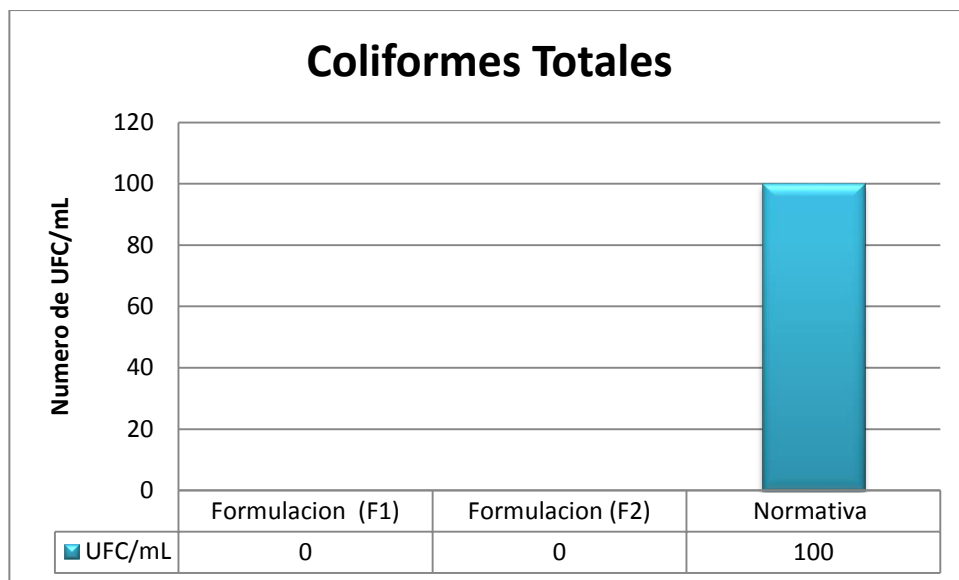
### 3.4.3. DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES Y *E. coli*



**Gráfico N° 12 Relación de Coliformes fecales y *E. coli* en las Formulaciones**

Tal como se observa en el gráfico N° 12 la formulación (F1) y (F2) cumplen con los parámetros microbiológicos en cuanto a la ausencia total de estos microorganismos patógenos en los alimentos balanceados para ratones de laboratorio establecidos la *National Research Council Committee*, la presencia de estos microorganismos son controlados con un antibióticos que es adicionado por ser una formulación de ingredientes naturales.

### 3.4.4. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES



**Gráfico N° 13 Relación de Coliformes Totales en las Formulaciones**

Tal como se observa en el gráfico N° 13 en la formulación (F1) y (F2) no hay la presencia de Coliformes totales las muestras analizadas cumpliendo con los parámetros microbiológicos establecidos por la *National Research Council Committee* y datos que son corroborados con la ausencia de Coliformes totales y *E. coli*

### 3.5. EVALUACIÓN DE INCREMENTO DE PESO

**CUADRO N° 3 EVALUACIÓN DE INCREMENTO DE PESO PARA FORMULACIÓN DE BLANCO (F)**

FORMULACION DE BLANCO									
Edad	Día ensayo	Incremento de peso(g)/día				Variación de Incremento de peso(g)			
		M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
Día 21	Día 1	8	6.9	6.7	8.7	NO APLICABLE			
Día 22	Día 2	14.3	11.1	10.7	11.5	6.3	4.2	4.0	2.8
Día 23	Día 3	14.3	11.2	10.7	11.7	0.0	0.1	0.0	0.2
Día 24	Día 4	16.3	13.2	13.0	13.9	2.0	2.0	2.3	2.2
Día 25	Día 5	16.8	14.6	14.5	15.1	0.5	1.4	1.5	1.2
Día 26	Día 6	17.1	14.9	14.6	15.3	0.3	0.3	0.1	0.2
Día 27	Día 7	17.2	15.3	15.2	15.7	0.1	0.4	0.6	0.4
Día 28	Día 8	17.2	16.4	15.9	16.5	0.0	1.1	0.7	0.8
Día 29	Día 9	17.3	16.7	16.1	17.3	0.1	0.3	0.2	0.8
Día 30	Día 10	17.3	16.7	16.1	18.3	0.0	0.0	0.0	1.0
Día 31	Día 11	18.1	17.5	16.4	20.1	0.8	0.8	0.3	1.8
Día 32	Día 12	19.5	18.7	17.3	20.3	1.4	1.2	0.9	0.2
Día 33	Día 13	22.1	19.0	20.3	20.9	2.6	0.3	3.0	0.6
Día 34	Día 14	22.1	19.8	21.0	21.9	0.0	0.8	0.7	1.0
Día 35	Día 15	23.2	21.7	21.3	22.2	1.1	1.9	0.3	0.3
Día 36	Día 16	23.0	21.7	21.1	22.1	-0.2	0.0	-0.2	-0.1
Día 37	Día 17	23.0	21.8	21.1	22.3	0.0	0.1	0.0	0.2
Día 38	Día 18	24.9	23.4	22.0	24.1	1.9	1.6	0.9	1.8
Día 39	Día 19	26.6	24.3	23.3	24.3	1.7	0.9	1.3	0.2
Día 40	Día 20	27.4	23.7	23.9	25.3	0.8	-0.6	0.6	1.0
Día 41	Día 21	27.4	25.0	25.6	26.3	0.0	1.3	1.7	1.0
Día 42	Día 22	29.0	25.6	25.0	27.4	1.6	0.6	-0.6	1.1
Día 43	Día 23	29.9	26.8	25.4	29.1	0.9	1.2	0.4	1.7
Día 44	Día 24	30.7	28.2	26.3	30.0	0.8	1.4	0.9	0.9
Día 45	Día 25	31.2	28.4	26.4	30.1	0.5	0.2	0.1	0.1
Día 46	Día 26	31.4	28.8	26.7	30.3	0.2	0.4	0.3	0.2
Día 47	Día 27	31.6	25.8	26.8	29.8	0.2	-3	0.1	-0.5
Día 48	Día 28	32.3	24.4	26.7	29.4	0.7	-1.4	-0.1	-0.4
Día 49	Día 29	32.6	24.0	26.2	31.4	0.3	-0.4	-0.5	2.0
Día 50	Día 30	32.3	23.1	26.8	33.4	-0.3	-0.9	0.6	2.0
Día 51	Día 31	31.9	28.7	26.6	34.0	-0.4	5.6	-0.2	0.6
Día 52	Día 32	31.6	26.3	26.6	33.2	-0.3	-2.4	0.0	-0.8
Día 53	Día 33	31.9	26.7	26.7	31.9	0.3	0.4	0.1	-1.3
Día 54	Día 34	31.5	26.8	26.8	31.8	-0.4	0.1	0.1	-0.1
PROMEDIO						0.71	0.60	0.61	0.70

**CUADRO N° 4 EVALUACIÓN DE INCREMENTO DE PESO PARA LA FORMULACIÓN (F1)**

<b>FORMULACION (F1)</b>									
<b>Edad del Ratón</b>	<b>Día de ensayo</b>	<b>Incremento de peso(g)/día</b>				<b>Variación de Incremento de peso(g)</b>			
		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
<b>Día 21</b>	<b>Día 1</b>	7.9	7.8	8.0	8.1	<b>NO APLICABLE</b>			
<b>Día 22</b>	<b>Día 2</b>	10.3	10.1	10.7	10.5	2.4	2.3	2.7	2.4
<b>Día 23</b>	<b>Día 3</b>	13.3	13.2	13.7	13.7	3.0	3.1	3.0	3.2
<b>Día 24</b>	<b>Día 4</b>	14.3	14.2	14.5	15	1.0	1.0	0.8	1.3
<b>Día 25</b>	<b>Día 5</b>	16.8	16.6	16.5	16.1	2.5	2.4	2.0	1.1
<b>Día 26</b>	<b>Día 6</b>	17.1	16.9	16.6	16.3	0.3	0.3	0.1	0.2
<b>Día 27</b>	<b>Día 7</b>	17.2	16.3	16.2	16.7	0.1	-0.6	-0.4	0.4
<b>Día 28</b>	<b>Día 8</b>	17.0	17.1	16.9	17.5	-0.2	0.8	0.7	0.8
<b>Día 29</b>	<b>Día 9</b>	17.3	17.7	17.1	17.7	0.3	0.6	0.2	0.2
<b>Día 30</b>	<b>Día 10</b>	17.5	17.7	17.3	18.3	0.2	0.0	0.2	0.6
<b>Día 31</b>	<b>Día 11</b>	18.0	18.1	18.2	20.1	0.5	0.4	0.9	1.8
<b>Día 32</b>	<b>Día 12</b>	18.8	18.7	19.3	20.3	0.8	0.6	1.1	0.2
<b>Día 33</b>	<b>Día 13</b>	20.8	20.1	20.7	20.9	2.0	1.4	1.4	0.6
<b>Día 34</b>	<b>Día 14</b>	21.9	20.8	21.2	21.7	1.1	0.7	0.5	0.8
<b>Día 35</b>	<b>Día 15</b>	23.2	21.7	21.3	22.2	1.3	0.9	0.1	0.5
<b>Día 36</b>	<b>Día 16</b>	23.8	22.4	22.1	23.1	0.6	0.7	0.8	0.9
<b>Día 37</b>	<b>Día 17</b>	24.2	23.8	23.1	23.3	0.4	1.4	1.0	0.2
<b>Día 38</b>	<b>Día 18</b>	24.9	24.3	24.1	24.1	0.7	0.5	1.0	0.8
<b>Día 39</b>	<b>Día 19</b>	26.6	25.4	25.1	24.9	1.7	1.1	1.0	0.8
<b>Día 40</b>	<b>Día 20</b>	27.2	26.7	25.9	25.4	0.6	1.3	0.8	0.5
<b>Día 41</b>	<b>Día 21</b>	27.4	27.1	26.4	26.1	0.2	0.4	0.5	0.7
<b>Día 42</b>	<b>Día 22</b>	29.1	28.5	27.1	27.0	1.7	1.4	0.7	0.9
<b>Día 43</b>	<b>Día 23</b>	29.5	28.8	28.4	28.4	0.4	0.3	1.3	1.4
<b>Día 44</b>	<b>Día 24</b>	30.6	29.8	29.3	29.7	1.1	1.0	0.9	1.3
<b>Día 45</b>	<b>Día 25</b>	31.2	30.4	30.4	30.1	0.6	0.6	1.1	0.4
<b>Día 46</b>	<b>Día 26</b>	32.4	31.6	31.5	31.8	1.2	1.2	1.1	1.7
<b>Día 47</b>	<b>Día 27</b>	32.6	32.4	31.8	32.8	0.2	0.8	0.3	1.0
<b>Día 48</b>	<b>Día 28</b>	32.8	32.4	32.3	32.9	0.2	0.0	0.5	0.1
<b>Día 49</b>	<b>Día 29</b>	33.0	32.4	32.6	31.4	0.2	0.0	0.3	-1.5
<b>Día 50</b>	<b>Día 30</b>	33.3	32.5	33.8	32.4	0.3	0.1	1.2	1.0
<b>Día 51</b>	<b>Día 31</b>	33.4	32.9	34.0	32.8	0.1	0.4	0.2	0.4
<b>Día 52</b>	<b>Día 32</b>	33.5	33.0	34.1	33.2	0.1	0.1	0.1	0.4
<b>Día 53</b>	<b>Día 33</b>	33.5	33.1	34.2	33.4	0.0	0.1	0.1	0.2
<b>Día 54</b>	<b>Día 34</b>	33.5	33.0	34.0	33.3	0.0	-0.1	-0.2	-0.1
<b>PROMEDIO</b>						0.78	0.76	0.79	0.76

**CUADRO N° 5 EVALUACIÓN DE INCREMENTO DE PESO PARA LA FORMULACIÓN (F2)**

<b>FORMULACION (F2)</b>									
<b>Edad del ratón</b>	<b>Día ensayo</b>	<b>Incremento de peso(g)/día</b>				<b>Variación de Incremento de peso (g)</b>			
		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
<b>Día 21</b>	<b>Día 1</b>	6.9	6.9	6.7	7.3	NOAPLICABLE			
<b>Día 22</b>	<b>Día 2</b>	7.3	7.1	7.7	7.8	0.4	0.2	1.0	0.5
<b>Día 23</b>	<b>Día 3</b>	8.3	8.2	8.7	8.7	1.0	1.1	1.0	0.9
<b>Día 24</b>	<b>Día 4</b>	10.3	10.2	9.8	10.9	2.0	2.0	1.1	2.2
<b>Día 25</b>	<b>Día 5</b>	16.8	14.6	14.5	15.1	6.5	4.4	4.7	4.2
<b>Día 26</b>	<b>Día 6</b>	17.1	14.9	14.6	15.3	0.3	0.3	0.1	0.2
<b>Día 27</b>	<b>Día 7</b>	17.2	15.3	15.2	15.7	0.1	0.4	0.6	0.4
<b>Día 28</b>	<b>Día 8</b>	17.2	16.4	15.9	16.5	0.0	1.1	0.7	0.8
<b>Día 29</b>	<b>Día 9</b>	17.3	16.7	16.1	17.3	0.1	0.3	0.2	0.8
<b>Día 30</b>	<b>Día 10</b>	17.3	16.7	16.1	18.3	0.0	0.0	0.0	1.0
<b>Día 31</b>	<b>Día 11</b>	18.1	17.5	16.4	20.1	0.8	0.8	0.3	1.8
<b>Día 32</b>	<b>Día 12</b>	19.5	18.7	17.3	20.3	1.4	1.2	0.9	0.2
<b>Día 33</b>	<b>Día 13</b>	22.1	19.0	20.3	20.9	2.6	0.3	3.0	0.6
<b>Día 34</b>	<b>Día 14</b>	22.1	19.8	21.0	21.9	0.0	0.8	0.7	1.0
<b>Día 35</b>	<b>Día 15</b>	23.2	21.7	21.3	22.2	1.1	1.9	0.3	0.3
<b>Día 36</b>	<b>Día 16</b>	23.0	21.7	21.1	22.1	-0.2	0.0	-0.2	-0.1
<b>Día 37</b>	<b>Día 17</b>	23.0	21.8	21.1	22.3	0.0	0.1	0.0	0.2
<b>Día 38</b>	<b>Día 18</b>	24.9	23.4	22.0	24.1	1.9	1.6	0.9	1.8
<b>Día 39</b>	<b>Día 19</b>	26.6	24.3	23.3	24.3	1.7	0.9	1.3	0.2
<b>Día 40</b>	<b>Día 20</b>	27.4	23.7	23.9	25.3	0.8	-0.6	0.6	1.0
<b>Día 41</b>	<b>Día 21</b>	27.1	25.0	25.6	26.2	-0.3	1.3	1.7	0.9
<b>Día 42</b>	<b>Día 22</b>	28.0	25.6	25.7	27.1	0.9	0.6	0.1	0.9
<b>Día 43</b>	<b>Día 23</b>	28.9	26.8	25.4	28.1	0.9	1.2	-0.3	1.0
<b>Día 44</b>	<b>Día 24</b>	30.1	28.2	26.0	29.0	1.2	1.4	0.6	0.9
<b>Día 45</b>	<b>Día 25</b>	30.2	27.4	26.4	30.1	0.1	-0.8	0.4	1.1
<b>Día 46</b>	<b>Día 26</b>	30.4	28.3	26.7	30.3	0.2	0.9	0.3	0.2
<b>Día 47</b>	<b>Día 27</b>	30.6	28.8	27.5	29.8	0.2	0.5	0.8	-0.5
<b>Día 48</b>	<b>Día 28</b>	30.3	28.4	28.0	29.4	-0.3	-0.4	0.5	-0.4
<b>Día 49</b>	<b>Día 29</b>	30.6	29.0	28.2	30.4	0.3	0.6	0.2	1.0
<b>Día 50</b>	<b>Día 30</b>	30.3	29.1	28.8	30.4	-0.3	0.1	0.6	0.0
<b>Día 51</b>	<b>Día 31</b>	30.3	29.7	29.6	30.4	0.0	0.6	0.8	0.0
<b>Día 52</b>	<b>Día 32</b>	30.6	29.8	29.3	30.2	0.3	0.1	-0.3	-0.2
<b>Día 53</b>	<b>Día 33</b>	30.2	29.9	29.3	30.4	-0.4	0.1	0.0	0.2
<b>PROMEDIO</b>						0.73	0.72	0.71	0.72

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**CUADRO N° 6 VARIABLES ESTADÍSTICAS**

Grupos	( F )	(F1)	(F2)
<b>N</b>	4	4	4
<b>Media</b>	0.6550	0.7725	0.7200
<b>Mediana</b>	0.6550	0.7700	0.7200
<b>Varianza</b>	0.0034	0.0002	0.0007E-1
<b>Desviación Típica</b>	0.0580	0.0150	0.0082
<b>E.E. de la Media (*)</b>	0.0290	0.0075	0.0041
<b>Cuartil Inferior (q1)</b>	0.6050	0.7600	0.7150
<b>Cuartil Superior (q3)</b>	0.7050	0.7850	0.7250

(\*) Usar con propósito de estimación para el I.C. de la media

En los resultados de los cuadros N° 4, N° 5 y N° 6 se observa que los individuos tratados con la formulación (F1) presentan una media de incremento de peso de 0.7725 g mayor que los tratados con la formulación (F2) que presentaron 0.72 g y esta a su vez es mayor a la media 0.6550 g que corresponde a la formulación (F).

La desviación típica de la formulación (F)  $\pm 0.058$  es mayor que la desviación de la formulación de crecimiento de  $\pm 0.015$ , a pesar que las dos formulaciones no son considerablemente altas son indicativos que los resultados obtenidos de la formulación de crecimiento tienen mayor precisión entre sí, es decir menor dispersión de los valores de la formulación de crecimiento; la desviación de la formulación (F2) presenta una menor dispersión que la formulación (F1) debido a que su desviación típica es de  $\pm 0.0082$ .

La dispersión considerada en la amplitud de los gráficos de las respectivas formulaciones, se puede inferir que la formulación de blanco (F) posee mayor dispersión en sus valores con respecto a la (F1) y está a la vez con la (F2) que posee la menor dispersión de datos.

**CUADRO N° 6 ANÁLISIS DE ANOVA: UN FACTOR**

<b>Variable Respuesta:</b>		<b>PESO</b>			
<b>Variable Explicativa:</b>		<b>RATONES</b>			
<b>Número de Casos:</b>		12			
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p valor
<b>Entre Grupos</b>	0.0277	2	0.0139	11.3645	0.0034
<b>Dentro Grupos</b>	0.0110	9	0.0012		
<b>Total (corr.)</b>	0.0387	11			

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ , no existe diferencia significativa entre las medias de los pesos de los ratones.  $H_A: \mu_1 \neq \mu_2 = \mu_3$ ; al menos una de las medias del peso de los ratones es diferente.

Mediante la aplicación de Test de Anova con un nivel de significancia de 95%, donde  $p=0.0034 < \alpha = 0.05$ , por lo tanto se rechaza la  $H_0$  ( $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ ), concluyendo que si existe diferencia significativa en al menos una media de los tratamientos aplicados.

**CUADRO N° 7 COMPARACIONES MÚLTIPLES**

<b>Anova Un Factor</b>	
<b>Variable Respuesta:</b>	<b>PESO</b>
<b>Variable Explicativa:</b>	<b>RATONES</b>
<b>Número de Casos:</b>	<b>12</b>
<b>Método: Tukey HSD al 95.00%</b>	
<b>Grupos</b>	



RATONES	N	Media	Homogéneos
Blanco (F)	4	0.6550	(F-F2)
(F2)	4	0.7200	(F2-F) y (F2-F1)
(F1)	4	0.7725	(F1-F2)

#### CUADRO N° 8 DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS

Contraste	Diferencia	+/- Límite
Blanco (F) VS (F1)	*-0.1175	*0.0689
Blanco (F) VS (F2)	-0.0650	0.0689
(F1 ) VS (F2)	0.0525	0.0689

\* Diferencia estadísticamente significativa.

#### CUADRO N° 9 HOMOCEDASTICIDAD

Variable Respuesta:	PESO		
Variable Explicativa:	RATONES		
Número de Casos:	12		
Prueba C de Cochran:	0.9203	P-valor = 0.0032	
Prueba de Bartlett:	9.3567	P-valor = 0.0093	
Prueba de Levene:	83.7000	P-valor = 0.0002E-2	

$p=0.0002E-2 < \alpha = 0.05$ ; se rechaza la  $H_0$ , se puede realizar el Test de Anova.

Mediante la aplicación de Test de Tukey HSD con un nivel de significancia del 95,00 %, se concluye que existen dos grupos que no poseen diferencia significativa entre sus medias. El primer grupo está conformado por la formulación (F) y (F2), y el segundo por la formulación (F2) y (F1), lo que indica que no existe diferencia entre utilizar cualquiera de las dos formulaciones; sin embargo sí existe diferencia significativa en sus medias entre la formulación de (F1) y (F), y observando las medias de ambos grupos, se puede deducir de manera a priori que la formulación (F1) es mejor que la (F), ya que con esta se obtuvo una media de peso mayor que con (F).

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES.

1. Se formuló y elaboró dos alimentos balanceados (F1-F2) con requerimientos nutricionales apropiados y en base a ingredientes naturales para ratones de experimentación (*Mus musculus*) del bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
2. Se evaluó la eficacia de las formulaciones, determinándose que la F1 es óptima para el crecimiento y mantenimiento de los ratones de experimentación *Mus musculus*.
3. Se realizó el análisis fisicoquímico de las dos formulaciones del alimento balanceado, obteniéndose resultados que se ajustan a los requerimientos establecidos por la *National Research Council Committee* en razón de no existir NTE-INEN para este tipo de producto.
4. Los resultados del análisis microbiológico del alimento balanceado (F1-F2) se ajustan a los parámetros internacionales lo que ratifica su inocuidad.

## **CAPITULO V**

### **RECOMENDACIONES**

1. Se sugiere promover la producción de este alimento balanceado a través de una planta industrial en la ESPOCH, para satisfacer la demanda del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia y de otros bioterios existentes en otras universidades.
2. Se recomienda evaluar la eficacia del alimento balanceado a través de otros indicadores de calidad de la proteína (VPN, VB).
3. Realizar el análisis total de micronutrientes para correlacionarlos con los resultados proporcionados por el programa Nutrion Software.
4. Se recomienda determinar la vida útil o estabilidad de las formulaciones por medio de pruebas aceleradas y normales.

## CAPITULO VI

### RESUMEN

Se planteó la formulación, elaboración y control de calidad de un alimento balanceado para ratones de experimentación (*Mus musculus*) del bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, el alimento balanceado formulado está constituido por ingredientes naturales, pre-mezcla de minerales y vitaminas.

Se utilizó el método científico para evaluar las formulaciones en los ratones (*Mus musculus*) como material biológico para investigación, mediante técnicas de laboratorio determinándose la calidad e inocuidad del alimento.

Los resultados de la primera etapa son la evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas, para F1 los resultados fisicoquímicos detallan una constitución de sólidos totales del 92.77%, ceniza 5.06%, grasa 8.568%, fibra 4.15%, proteína del 20.87%, en base seca, 54.122% ELnN, pH 6.84, aerobios mesófilos es de  $2 \times 10^5$  UCF/mL, hongos 40 UFC/mL, ausencia de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*. Para la F2 los resultados detallan una constitución de sólidos totales del 92.09%, ceniza 4.6%, grasa 7.13%, fibra 4.1%, proteína del 17.68%, en base seca, 58.58% ELnN, pH 6.78, aerobios mesófilos es de  $3 \times 10^4$  UCF/mL, hongos 30 UFC/mL, ausencia de coliformes totales, coliformes

fecales y *E. coli*. En una segunda etapa se evaluó la eficacia de cada formulación obteniéndose una media de crecimiento de 0.7725g/día F1, 0.720g/día F2 y 0.655g/día (F), determinándose que F1 es óptima para el crecimiento y mantenimiento de los ratones de experimentación.

Se recomendó evaluar la eficacia de otros indicadores de calidad de la proteína (VPN, VB) y la vida útil del mismo.

## SUMARY

It was carried out the formulation, development and quality control of a balanced food for mice of experimentation (*Mus musculus*) of the Vivarium of Biochemistry and Pharmacy school from Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, the formulated balanced food is constituted by natural ingredients, pre mixture of minerals and vitamins.

The scientific method was used to evaluate the formulations in the mice (*Mus musculus*) like biological material for investigation, by means of laboratory techniques deciding the quality and harmlessness of the food.

The results of the first stage are the evaluation of the psychochemical and microbiological characteristics, for F1 the physicochemical results detail a constitution of entire solid of 92.77%, ash 5.06%, fat 8.568%, fiber 4.15%, protein of 20.87%, in dry basis, 54.122% ELnN, pH 6.84, mesophilic aerobic is  $2 \times 10^5$  UCF/mL, fungi 40 UFC/mL, absence of total coliforms, fecal coliforms and *E. coli*. For the F2 the results detail a constitution of total solids of 92.09%, ash 4.6%, fat 4.1%, protein of 17.68%, in dry basis, 58.585% ELnN, pH 6.78, mesophilic aerobic is  $3 \times 10^4$  UCF/mL, fungi 30 UFC/mL, absence of total coliforms, fecal coliforms and *E. coli*. In a second stage was evaluated the effectiveness

of each formulation resulting in an average growth of 0.7725 g/day F1, 0.720 g/day F2 and 0.655 g/day (F), determining that F1 is optimal for the growth and maintenance of experimental mice.

It was recommended to evaluate the efficacy of other quality indicators of the protein (VPN, VB) and the useful life of the same one.

## **CAPITULO VIII**

### **BIBLIOGRAFIA**

- 1. INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES COMMISSION ON LIFE SCIENCES NATIONAL RESEARCH COUNCIL.,** (E-book). Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, 1erEdición., Washington D.C., Editorial Academia Nacional De Medicina., 1996, p. 38-52.
- 2. COMMITTEE NATIONAL RESEARCH COUNCIL.,** (E-book). Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 4<sup>ta</sup> Ed., Washington D.C., 1995., p. 80-102
- 3. QUEZADA A.,** (E-book). Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. 1<sup>er</sup> Ed., Mérida-México., Editorial Universidad Autónoma de Yucatán., 1997, p. 15-17.
- 4. ALCOCK, W.,** Revista Científica. “Comparación de la deficiencia de magnesio en la rata y el ratón”. Washington - USA.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1974, N° 146., p.137-141.

5. **ALLEN, J.C.,** Revista Científica. “Miocardiopatía hemorrágica en ratones y hemotórax con deficiencia de vitamina K”. New York - USA. Journal of Toxicology. 1991, N° 19, p.589-596.
6. **ALLEN, J. C.,** Revista Científica. “Efecto de la deficiencia de vitamina D en la glándula mamaria del ratón y la leche”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1984, N° 114, p.42-49.
7. **ANDERSON, D. B.,** Revista Científica. “La influencia de la dieta sobre la composición de inositol glicérido y la síntesis en el hígado de ratas alimentadas con diferentes grasas”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1976, N° 106, p.529-536.
8. **ARCE, D. S.,** Revista Científica. “Consecuencias reversibles y persistentes de la deficiencia de cobre en ratones en desarrollo”. New York - USA Journal Toxicology. 1992, N° 6, p.211-221.
9. **AUGHEY, E.,** Revista Científica. “Los efectos de la suplementación con zinc por vía oral en el ratón”. Bristol - Gran Bretaña. Journal of Comparative Pathology. 1977, N° 87, p.1-14.



10. **BALL, B. Z.**, Revista Científica. “Efecto de diferentes suplementos dietéticos en el crecimiento y la lactancia en el ratón albino”. Washington - USA. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1941, N° 48, p.692-696.
11. **BAUER, D. C.**, Revista Científica. “Los aminoácidos necesarios para el crecimiento en ratones y la disponibilidad de sus isómeros ópticos”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1943, N° 26, p.51-63.
12. **BECK, E. M.**, Revista Científica. “La nutrición del ratón. IX. Estudios sobre la piridoxina y”. New Haven - USA. Yale Journal of Biology and Medicine. 1950, N° 23, p.190-194.
13. **BELL, J. M.**, Revista Científica. “Efectos de los niveles de proteína en la dieta y la energía digestible en el crecimiento, la utilización de los piensos y la composición corporal de los ratones en crecimiento”. Washington - USA. Journal Nutrition Research. 1992, N° 12, p.375-383.
14. **BELL, J. M.**, Revista Científica. “Requisitos de Aminoácidos de los ratones en crecimiento: arginina, lisina, triptófano y fenilalanina”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1981, N° 111, p.525-530.

15. **BELL, J. M.**, Revista Científica. “El requisito de potasio en la dieta del ratón cada vez mayor”. Washington - USA. Journal of Animal Science. 1958, N° 38, p.145-147.
16. **BELL, L.**, Revista Científica. “Efectos ultraestructurales de la deficiencia de manganeso en el hígado, el corazón, los riñones y el páncreas de los ratones”. Toronto - Canadá. Journal Laboratory Investigation. 1973, N° 29, p. 723-736.
17. **BELL, R. R.**, Revista Científica. “Metabolismo de la vitamina B6 en el ratón que la cepa. II. La oxidación del piridoxal”. Washington - USA. Journal Biochemistry and Biophysics. 1971, N° 147, p. 602-611.
18. **BELL, R. R.**, Revista Científica. “Los efectos a largo plazo de calcio, fósforo, y el ejercicio obligado de los huesos de ratones adultos”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1980, N° 110, p. 1161-1168.
19. **BERNIER, J.F.**, Revista Científica. “Mantenimiento requerimiento de energía y eficiencia energética de los ratones con un gen importante para ganancia post destete rápida”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1986, N° 116, p. 419-428.
20. **BLAKLEY, B. R.**, Revista Científica. “El efecto de la deficiencia de hierro sobre la respuesta inmune en ratones”. Houston -

USA. The American Journal of Clinical Nutrition. 1988, N° 5, p. 249-256.

21. **BLANCO, E. A.,** Revista Científica. “Deficiencia de ácidos grasos esenciales en el ratón”. Washington - USA. Journal Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1943, N° 54, p. 301-302.
22. **BRUCE, A. S.,** Revista Científica. “La alimentación y la cría de animales de laboratorio. IX. Una dieta completa en cubos para los ratones y las ratas”. Cambridge - Reino Unido, The Journal of Hygiene. 1949, N° 47, p. 202-208.
23. **BRYAN, W. L.,** Revista Científica. “Deficiencia de vitamina E en el ratón”. Bethesda - USA. Journal American of Physiology. 1999, N° 131, p. 263-267.
24. **BUCCI, T. J.** Revista Científica. “Restricción de la dieta: ¿Por qué todo el interés? Una visión general: Animales de laboratorio”. Pennsylvania - USA. Journal Nutrition. 1992, N° 21, p. 29-34.
25. **BUCKLEY, G. F.,** Revista Científica. “Patología de la deficiencia de colina en el ratón”. Londres - Gran Bretaña. Journal Patology. 1955, N° 591, p. 85-197.

26. **CANOLTY, N. L.**, Revista Científica. “Utilización de la energía para el mantenimiento y aumento de grasa magra en ratones seleccionados para la tasa de rápido crecimiento post destete”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1976, N° 106, p. 1202-1208.
27. **CERECEDO, R. L.**, Revista Científica. “Crecimiento, la reproducción y la lactancia en los ratones con dietas altamente purificadas”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1944, N° 5, p. 157-161.
28. **CHATTERJEE, I. B.**, Revista Científica. “Metabolismo del ácido ascórbico”. Washington - USA. Journal Nutrition Dietet. 1978, N° 30, p. 69-87.
29. **CROCKER, J.**, Revista Científica. “La toxicidad comparativa de metabolitos de la vitamina D en el ratón recién destetados”. New York - USA. Journal Toxicology. 1985, N° 80, p. 119-126.
30. **CSALLANY, S. A.**, Revista Científica. “Efecto de la dieta de vitamina E y el envejecimiento de la concentración del pigmento lipofuscina tejidos en ratones”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1977, N° 107, p. 1792-1799.

31. **DAVIS, G. K.**, Revista Científica. “Cobre. Elementos Traza en Nutrición Humana y Animal”. Washington - USA. Journal Academic Press. 1987, N° 7, p. 301-364.
32. **FAHIM, F. A.**, Revista Científica. “Efectos de manganeso en la dieta y /o variables de manganeso en la tasa de crecimiento y el metabolismo de los ratones”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1990, N° 34, p.183-192.
33. **FENTON, P. F.**, Revista Científica. “La nutrición del ratón. I. Una diferencia en los requisitos de la riboflavina de dos cepas altamente endogámica”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1947, N° 34, p. 273-283.
34. **FRIEDMAN, M.**, Revista Científica. “La utilización y seguridad de los isómeros de azufre que contienen los aminoácidos en ratones”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1984, N° 114, p. 2301-2310.
35. **FRIEDMAN, M.**, Revista Científica. “El valor nutritivo y seguridad de la D-fenilalanina y D-tirosina en ratones”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1984, N° 114, p. 2089-2096.
36. **FULLERTON, F. M.**, Revista Científica. “Las condiciones de almacenamiento en las dietas”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1982, N° 112, p. 567-573.

37. **GOETTSCH, M. A.**, Revista Científica. “Requisito de alfa-tocoferol del ratón”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1942, N° 23, p. 513-523.
38. **GOODRICK, C. L.**, Revista Científica. “Los efectos de las proteínas de la dieta sobre el crecimiento de los ratones endogámicas e híbridos”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1973, N° 37, p. 355-367.
39. **HAUSCHILDT, J. D.**, Revista Científica. “Tiamina requisito de ratones albinos”. Washington - USA. Journal Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1942, N° 49, p. 145-147.
40. **HOPPEL, C. L.**, Revista Científica. “Riboflavina y la estructura celular del ratón y la función hepática: El metabolismo oxidativo mitocondrial en los estados de deficiencia severa”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1975, N° 105, p. 562-570.
41. **HORIO, F.**, Revista Científica. “Requisito para los ratones de ácido ascórbico. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1985, N° 115, p. 1630-1640.
42. **HUNDEMER, J.K.**, Revista Científica. “Fuentes de fibra dietética”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1991, N° 121, p-1360-1365.

43. **KINDBERG, C. G.**, Revista Científica. “Efecto de la ingesta de varios de filoquinona en los signos de deficiencia de vitamina K y el suero y las concentraciones de filoquinona hígado en la rata”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1989, N° 119, p. 175-180.
44. **LEITER, E. H.**, Revista Científica. “Influencia de los carbohidratos de la dieta”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1983, N°. 113, p.184-195.
45. **LUECKE, R. W.**, Revista Científica. “El efecto de variar los niveles de zinc en el crecimiento y la respuesta mediada por anticuerpos en dos cepas de ratones”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1979, N° 109, p. 1373-1376.
46. **MCCARTHY, P. T.**, Revista Científica. “Deficiencia de vitamina A en el ratón”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1952, N° 46, p. 361-376.
47. **MEADER, D. R.**, Revista Científica. “Deficiencia de colina en el ratón”. Cambridge - Reino Unido. Journal Anatomy. 1957, N° 100, p. 167-203.
48. **NIELSEN, E.**, Revista Científica. “Biotina y la deficiencia de ácido fólico en el ratón”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1944, N° 28, p. 203-207.

49. **PASTOR, N. D.**, Revista Científica. “Una reevaluación de la situación de mio-inositol como una vitamina”. Cambridge - Reino Unido. Journal Proceedings of the Nutrition Society. 1974, N° 33, p.63.
50. **SANTHANAM, U.**, Revista Científica. “Desarrollo de régimen dietético para lograr la supervivencia a largo plazo y subclínica de vitamina A, el estado deficiente en los ratones”. New Delhi - India. Journal Indian of Experimental Biology. 1987, N° 25, p.164-168.
51. **SORBIE, J.**, Revista Científica. “Hierro equilibrio en el ratón”. Washington - USA. Journal Laboratory Animal Ciencia. 1974, N° 24, p. 900-904.
52. **TOVE, S. B.**, Revista Científica. “Cinética de la disminución de ácido linoléico en ratones”. New Delhi - India. Indian Journal Biochemistry and Biophysics. 1959, N° 85, p. 352-365.
53. **TSAO, C. S.**, Revista Científica. “Efecto de la ingesta de ácido ascórbico en los tejidos en los ratones”. Pennsylvania - USA. Journal of Nutrition. 1987., N° 117, p. 291-297.
54. **WRETLIND, K. A.**, Revista Científica. “Metionina requisito para el crecimiento y la utilización de sus isómeros ópticos”.



Londres - Reino Unido. Journal Biology Chemistry. 1950, N°  
187, p. 697-703.

**55. NECESIDADES NUTRICIONALES DE RATONES *Mus*  
*musculus***

[http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=4758&page=86](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=4758&page=86)

**2011-08-09**

